BIOCHIMIE CLINICĂ

EUGEN MÓDY
ILEANA FUNDUC
RUXANDRA ALEXANDRESCU
MINODORA DOBREANU

ALL medicALL

PATOCHIMIE

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III 280.337

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
III 280.337

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EUGEN MÓDY
ILEANA FUNDUC
RUXANDRA ALEXANDRESCU
MINODORA DOBREANU

BIOCHIMIE CLINICĂ

(PATOCHIMIE)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biochimie clinică (Patochimie)
Eugen Módy, Ileana Funduc, Ruxandra Alexandrescu, Minodora Dobreanu
Copyright © 2000 editura **ALL EDUCATIONAL.**

Toate drepturile sunt rezervate Editurii **ALL EDUCATIONAL.** Nici o parte din acest volum nu poate fi copiată fără permisiunea scrisă a Editurii **ALL EDUCATIONAL.** Drepturile de distribuţie în străinătate aparţin în exclusivitate editurii.

The distribution of this book outside Romania, without the written permission of **ALL EDUCATIONAL** is strictly prohibited.

Copyright © 2000 by **ALL EDUCATIONAL.** All rights reserved.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
Biochimie clinică (Patochimie)/ Eugen Módy, Ileana Funduc, Ruxandra Alexandrescu, Minodora Dobreanu - Bucureşti: ALL EDUCATIONAL, 2000
592 p.; 24 cm - (ALL MEDICAL)
Bibliograf.
ISBN 973-684-021-2
I. Módy, Eugen
II.Funduc, Ileana
III.Alexandrescu,Ruxandra
IV. Dobreanu, Minodora

577.1:616

Editura **ALL EDUCATIONAL** Bd Timişoara nr. 58, sector 6
Bucureşti, cod 76548

☎ 402 26 00
Fax: 402 26 10

Departamentul difuzare ☎ 402 26 20
Fax: 402 26 30

Comenzi la: comenzi@all.ro

URL http://www.all.ro

Redactori: dr. Luminiţa Zaharia, dr. Răzvan Petrescu
Director artistic: Sorin Dumitrescu

PRINTED IN ROMANIA
ARTA GRAFICA S.A.
Calea Şerban Vodă nr. 133, Sector 4, Cod 70517, BUCUREŞTI
Tel.: 336.29.11 Fax: 337.07.35

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EUGEN MÓDY – Acad. Prof. consultant Catedra de Biochimie Clinică și Imunopatologie, UMF Târgu Mureș
ILEANA FUNDUC – Dr. chimist cercetător științific principal I Clinica de Hematologie Spitalul Fundeni
RUXANDRA ALEXANDRESCU – Dr. biolog cercetător științific
MINODORA DOBREANU – Dr. medicină, șef disciplină Catedra de Biochimie Clinică, UMF Târgu Mureș

480.646

BIOCHIMIE CLINICĂ

(PATOCHIMIE)

(lipsă pg. 433-465)

376337
B.C.U. IASI

ALE

2000
ALL

BCU IASI CENTRALA

Din colecția de medicină umană a Editurii ALL mai sunt disponibile următoarele titluri :

1. **Anatomia omului (vol I, II)** – Victor Papilian. Ediție îngrijită de Ion Albu
2. **Anatomie topografică** – Ion Albu, Radu Georgia *(ediție revăzută și adăugită)*
3. **Afecțiunile buco-dentare și sarcina** – Petrache Vârtej, Memet Gafar, Henriette Panaitte
4. **Alergologie- fiziopatologie, diagnostic, tratament** – sub redacția Ion Gr. Popescu
5. **Anestezia subarahnodiană și peridurală** – Ion Cristea
6. **Atlas de anatomie la patul bolnavului** – Nicolae Constantinescu
7. **Atlas de anatomie Winterthur** - K. J. Moll, M. Moll *(traducere din limba germană)*
8. **Acupunctura în obstetrică și ginecologie** – Vasile Tureanu, Luminița Tureanu
9. **Chimie farmaceutică, vol I** – Gheorghe Dănilă
10. **Curs de morfopatologie** – Constantin Tașcă
11. **Depresii: noi perspective** – sub redacția: Radu Vraști , Martin Eisemann
12. **Despre alimentația copilului infectat cu HIV** – Sorin Petrea
13. **Elemente de psihoterapie** – Irina Holdevici (*ediție revăzută și adăugită)*
14. **Enciclopedia de balneoclimatologie a României** - Elena Berlescu *(reeditare)*
15. **Explorarea ultrasonică a sistemului vascular cervico– cerebral** – Andrei Nistorescu
16. **Farmacologie** - sub red. V. Stroescu
17. **Farmacologie. Teste de autoevaluare** - sub red. V. Stroescu
18. **Ghid clinic de pediatrie (consultație - diagnostic - terapie - urgențe)** - Stephan Illing, Stephanie Spranger *(traducere din limba germană)*
19. **Imunologia în teoria și practica medicinei, vol I și II** - sub redacția: Dan Perețianu, Marcel Saragea
20. **Investigații funcționale în practica medicinei de familie** – Alexandru Gheorghiu, Marinela Olăroiu
21. **Indreptar pentru prescrierea medicamentelor** - V. Stroescu și colab.
22. **Îngrijirea sugarului și copilului mic** – Benjamin Spock, B. Rothenberg *(traducere din limba engleză)*
23. **Istoria medicinei** – Radu Iftimovici
24. **Medicamente moderne de sinteză** – Gheorghe Dănilă
25. **Mic dicționar de medicamente** – Valentin Stroescu
26. **Microsisteme, timpi optimi și puncte extrameridian în acupunctură** – Valentin Tureanu
27. **Obstetrică fiziologică și patologică** – sub redacția Petrache Vârtej *(reeditare)*
28. **Parazitologie medicală** – Simona Rădulescu
29. **Sănătate publică și management sanitar** – Dan Enăchescu, Mihai Gr. Marcu *(reeditare)*
30. **SIDA. Trecerea oprită** – Sorin Petrea
31. **600 de teste pentru concursul de rezidențiat** – Dinu Nodiț, Laurența Mirică *(reeditare)*
32. **777 întrebări de acupunctură** – Theodor Caba, Theodora Caba
33. **Particularități terapeutice în geriatrie** - OMS *(traducere din limba engleză)*
34. **Tratamentul tuberculozei - Directivele OMS pentru Programele Naționale** - OMS *(traducere din limba engleză)*
35. **ICD-10 Clasificarea tulburărilor mentale și de comportament** - OMS *(traducere din limba engleză)*

În curând:

1. **Atlas de anatomie McMinn** - P. H. Abrahams, R. T. Hutchings, S. C. Marks Jr. *(traducere din limba engleză)*
2. **Atlas de radiologie** - P.E.S. Palmer, W. P. Cockshott, V. Hegedus, E. Samuel *(traducere din limba engleză)*
3. **Compediu de electrocardiografie clinică** – Eugen D. Popescu *(reeditare)*
4. **Elemente clinice de stomatologie** - Cara M. Miyasaki-Ching *(traducere din limba engleză)*
5. **Ghid clinic de chirurgie** - G.R. McLatchie *(traducere din limba engleză)*
6. **Ghid clinic de terapie intensivă** - J. Braun, R. Preuss *(traducere din limba germană)*
7. **Ghid clinic de stomatologie** - D.A. Mitchell, Laura MItchell *(traducere din limba engleză)*
8. **Materiale dentare reconstructive** - coord. R. Craig *(traducere din limba engleză)*

– 4 MAR. 2005

CUPRINS

În memoria Dnei Dr. Marcela Zamfirescu Gheorghiu,
eminentă personalitate medicală
în domeniul laboratorului clinic.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte XIII
Introducere XV

CAPITOLUL 1
Laboratorul de analize medicale, sursă informaţională medicală de bază (Prof.Dr. med. E. Módy, Dr.chim. Ileana Funduc) 1

1.1. Sistemul internaţional al unităţilor de măsură 2
1.2. Criteriile de calitate ale analizelor de laborator 5
1.3. Controlul intern de calitate al analizelor de laborator 6

CAPITOLUL 2
Celula, unitatea morfofuncţională a organismului viu (Dr.biol. Ruxandra Alexandrescu, Prof.Dr. med. E. Módy) 9

2.1. Spaţiul biologic 11
2.2. Timpul biologic 12
2.3. Bioenergetica. Cataliza enzimatică. 13
2.4. Membrana celulară 15
2.4.1. Structura membranei 17
2.4.2. Lipidele din membrană 18
2.4.3. Proteinele din membrană: glicoproteinele şi lipoproteinele 20
2.5. Citoplasma 26
2.6. Structura şi funcţiile microorganitelor celulare: lizozomii, ribozomii, mitocondriile, aparatul Golgi, microcentrul 29
2.6.1. Lizozomii 29
2.6.2. Ribozomii 31
2.6.3. Mitocondriile 32
2.6.4. Aparatul Golgi 33
2.7. Nucleul celular 35
2.7.1. Structura nucleului celular 35

CAPITOLUL 3
Mecanica chimică: structura şi proprietăţile biomoleculelor (Dr.chim. Ileana Funduc) 42

3.1. Apa şi substanţele minerale 43
3.1.1. Apa în organism 43
3.1.2. Sărurile minerale 46
3.2. Vitaminele 49
3.2.1. Vitaminele hidrosolubile 50
3.2.2. Vitaminele liposolubile 52
3.3. Proteinele 54
3.3.1. Aminoacizii, legătura peptidică, structură şi proprietăţi 54
3.3.2. Metodele de separare 62
3.3.3. Proteinele simple şi combinate 65
3.3.4. Funcţiile biologice 67
3.4. Glucidele 69
3.4.1. Structura şi proprietăţile mono-, oligo- şi polizaharidelor 69
3.4.2. Funcţiile biologice 75
3.4.3. Metodele de identificare şi dozare 77
3.5. Lipidele 79
3.5.1. Lipidele complexe şi lipidele simple 80
3.5.2. Proprietăţi 85
3.5.3. Funcţiile biologice 86
3.5.4. Metodele de analiză 87
3.6. Acizii nucleici 91

CAPITOLUL 4
Dinamica chimică: metabolismul celular, biosinteza şi descompunerea biomoleculelor (Dr.biol. Ruxandra Alexandrescu, Prof.Dr. med. E. Módy) 96

4.1. Metabolismul normal şi patologic al proteinelor 97
4.1.1. Biosinteza aminoacizilor 97
4.1.2. Biosintezele compuşilor derivaţi din aminoacizi 98
4.1.3. Reglarea biosintezei aminoacizilor 104
4.1.4. Degradarea aminoacizilor şi ciclul ureei 105
4.1.5. Recirculaţia proteică 115
4.1.6. Metabolismul intermediar al proteinelor. Informaţia genetică 119
4.2. Metabolismul normal şi patologic al glucidelor 141
4.2.1. Metabolismul glucidelor. Glicoliza 143
4.2.2. Piruvat-dehidrogenaza şi ciclul acidului citric 158
4.2.3. Transportul de electroni şi fosforilarea oxidativă în mitocondrie 167
4.2.4. Căile alternative ale metabolismului glucidelor 181
4.2.5. Gluconeogeneza 188

BCU CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

4.2.6. Metabolismul glicogenului 196
4.3. Metabolismul normal şi patologic al lipidelor 205
4.4. Mecanisme de reglare a metabolismului 222
4.5. Elemente de genetică medicală 243
4.5.1. Anatomia unui cromozom 243
4.5.2. Genele şi mediul înconjurător 245
4.5.3. Recombinările genetice 247
4.5.4. Mecanismul de reparare a erorilor genetice 248
4.5.5. Legile lui Gregor Mendel 249
4.5.6. Garnitura cromozomială a celulelor somatice: cariograma ... 250
4.5.7. Erorile înnăscute ale metabolismului 251
4.5.8. Materialul genetic al citoplasmei 254
4.5.9. Genele dezlănţuite: virusurile 256
4.5.10. Oncogenele 259

CAPITOLUL 5
Mediul intern al organismului. Homeostazia. Echilibrul hidromineral (Prof.Dr. med. E. Módy, Dr.chim. Ileana Funduc, Dr.biol. Ruxandra Alexandrescu) 262

5.1. Apa şi viaţa 263
5.2. Sângele 267
5.2.1. Volumul şi osmolaritatea plasmei 267
5.2.2. Izoosmoza şi izoionia 269
5.2.3. Lichidul tisular 270
5.2.4. Schimburile hidrodinamice şi difuziunea 270
5.2.5. Biopotenţialul de membrană 272
5.2.6. Izoosmoza şi izovolemia 274
5.3. Echilibrul acido-bazic 276
5.3.1. Concentraţia ionilor de hidrogen, noţiunea de pH 277
5.3.2. Stabilizarea acidităţii soluţiilor: sistemele tampon 278
5.3.3. Stabilirea valorii pH a unei soluţii tampon 279
5.3.4. Mecanismul pulmonar al reglării echilibrului acido-bazic 281
5.3.5. Mecanismul metabolic al regenerării bicarbonaţilor consumaţi 281
5.3.6. Tulburările echilibrului acido-bazic 282
5.3.7. Aciditatea şi osmoza 285
5.3.8. Pierderile de sare şi echilibrul acido-bazic 285
5.3.9. Potasemia şi echilibrul acido-bazic 286
5.4. Plasma sanguină 286
5.4.1. Volumul plasmatic, osmoza, conţinutul mineral 286
5.4.2. Oligoelementele din plasma sanguină: fierul, cuprul, zincul, cobaltul, manganul 290
5.4.3. Proteinele plasmatice 299

5.4.4. Glicoproteinele plasmatice 314
5.4.5. Lipoproteinele plasmatice 316
5.4.6. Imunoglobulinele din plasmă 325
5.4.7. Enzimele din plasmă 328
5.4.8. Hemostaza şi coagularea 359
5.5. Elementele figurate ale sângelui: hematopoieza normală şi patologică 385
5.5.1. Eritrocitele şi hemoglobina 385
5.5.2. Grupele sanguine 393
5.5.3. Leucocitele 399

CAPITOLUL 6
Modificările funcţionale ale sistemului imun de apărare (Prof.Dr. med. E. Módy)..402

6.1. Noţiunea de antigen 403
6.1.1. Markerii celulari ai individualităţii biologice. Sistemul major de histocompatibilitate 403
6.1.2. Receptorii B-limfocitari: imunoglobulinele 405
6.1.3. Receptorul T-limfocitar 408
6.2. Apărarea nespecifică a organismului 409
6.2.1. Apărarea nespecifică celulară-tisulară 409
6.2.2. Apărarea nespecifică umorală 410
6.3. Răspunsul imun primar şi secundar 413
6.3.1. Răspunsul imun primar 413
6.3.2. Răspunsul imun secundar 415
6.4. Apărarea specifică a organismului 416
6.5. Tulburările înnăscute şi dobândite ale imunităţii 416
6.5.1. Tulburările ereditare ale endocitozei 417
6.5.2. Tulburările dobândite ale endocitozei 418
6.5.3. Deficienţa ereditară a factorilor properdinici şi de complement 418
6.5.4. Stări imunodeficitare ereditare legate de limfocitele B 418
6.5.5. Tulburările ereditare ale imunităţii din cauza absenţei sau disfuncţiei limfocitelor T 419
6.5.6. Tulburările ereditare combinate ale limfocitelor B şi T 420
6.5.7. Tulburările dobândite ale apărării imune 420
6.6. Imunitatea antitumorală 423
6.7. Imunomodularea 425
6.7.1. Imunostimularea 425
6.7.2. Imunosupresarea 426
6.8. Reacţiile imune patologice 428
6.8.1. Reacţia imună patologică de tipul I (alergic, anafilactic sau atopic) 430
6.8.2. Reacţia imună patologică de tipul II, citotoxic 433

6.8.3. Reacţia imună patologică de tipul III (Arthus), prin complexe imune circulante 435
6.8.4. Reacţia imună de tipul IV (hiperegia T-limfocitară) 437
6.8.5. Toleranţa imună 437
6.9. Explorarea de laborator a apărării nespecifice şi specifice, celulare şi umorale 439

CAPITOLUL 7
Patochimia aparatului digestiv (Prof.Dr. med. E. Módy) 441

7.1. Funcţiile cavităţii bucale şi ale esofagului 442
7.2. Patochimia şi explorarea de laborator a funcţiilor gastrice 442
7.3. Explorarea de laborator a digestiei şi a reasorbţiei intestinale 446
7.4. Explorarea de laborator a funcţiilor pancreatice exocrine 448
7.5. Patochimia ficatului 450
7.5.1. Parenchimul hepatic 450
7.5.2. Sistemul biliar 452
7.5.3. Sistemul vascular hepatic 454
7.5.4. Sistemul macrofag-monocitar 455
7.5.5. Explorarea de laborator a funcţiilor hepatice 455

CAPITOLUL 8
Patochimia sistemului cardiovascular (Prof.Dr. med. E. Módy) 458
8.1. Miocardul 459
8.2. Explorarea de laborator a sistemului cardiovascular 461

CAPITOLUL 9
Patochimia funcţiilor renale (Prof.Dr. med. E. Módy) 463

CAPITOLUL 10
Patochimia sistemului endocrin: mecanismele comunicărilor inter- şi intracelulare (Prof.Dr. med. E. Módy) 470

10.1. Comunicările inter- şi intracelulare 471
10.2. Sistemul glandelor endocrine 472
10.2.1. Hipofiza 472
10.2.2. Reglarea secreţiilor hormonale 473
10.2.3. Encefalinele 474
10.2.4. Receptorii α şi β 474
10.2.5. Mecanismul de acţiune a hormonilor steroizi 476

CAPITOLUL 11
Patochimia sistemului nervos central (Dr. med. Minodora Dobreanu) ..479

11.1. Neuronul ..480
11.2. Metabolismul celulelor nervoase ..484
11.2.1. Tulburările metabolismului glucidic al neuronilor ..485
11.2.2. Tulburările metabolismului aminoacizilor ..486
11.2.3. Tulburările metabolismului lipidic ..488
11.2.4. Encefalopatiile metabolice, stări comatoase ..489
11.3. Sinapsa ..490
11.4. Neurotransmiţătorii şi receptorii ..491
11.4.1. Receptorii de acetilcolină ..493
11.4.2. Receptorii de catecolamine ..493
11.4.3. Receptorii de serotonină ..495
11.4.4. Receptorii de histamină ..496
11.4.5. Neuropeptidele şi receptorii de peptide ..497
11.4.6. Aminoacizii neurotransmiţători ..499
11.4.7. Neurotransmiţătorii purinici şi receptorii lor ..500
11.4.8. Neurotransmiţătorii şi receptorii inozitol fosfatici ..501
11.4.9. Neurotransmiţătorii prostaglandinici şi leucotrienici ..502
11.4.10. Patochimia funcţiilor nervoase superioare: gândirea, învăţarea, memoria ..503
11.4.11. Tulburările neurotransmiţătorilor şi receptorilor.
11.4.12. Patochimia stărilor psihotice ..503
11.5. Circulaţia sistemului nervos central ..505
11.6. Bolile sistemului nervos periferic ..506
11.7. Patochimia şi explorarea de laborator a lichidului cefalorahidian..507

CAPITOLUL 12
Purtătorii de semnale de origine vegetală: lectinele (Prof.Dr. med. E. Módy) 510

CAPITOLUL 13
Patochimia cancerului (Prof.Dr. med. E. Módy) ..514
13.1. Apărarea antitumorală ..518
13.2. Factorul de necroză tumorală ..518
13.3. Diagnosticul de laborator al tumorii maligne ..519
13.4. Markerii tumorali ..520

Bibliografie selectivă ..521
Breviar de laborator clinic ..523

CUVÂNT ÎNAINTE

Apariţia acestui tratat de *Biochimie clinică (Patochimie)* marchează - în fond - prezenţa unui echivalent *manual de biochimie pentru medici*, mult aşteptat. Într-adevăr, dacă pentru iniţierea în domeniul biochimiei a viitorilor medici este strict necesară disciplina de biochimie medicală, predată în primul an de facultate, învăţământul clinic - din anii superiori - implică reamintirea şi completarea cunoştinţelor de biochimie însuşite, prin relevarea legăturilor imediate cu problemele clinice propriu-zise. De fapt, biochimia medicală, studiată în anul I, are printre altele - şi următorul dublu scop:

1) să asigure asimilarea multor fenomene studiate în disciplinele înrudite (biologie, fiziologie, fiziopatologie, genetică, farmacologie) din învăţământul preclinic şi

2) să suscite interesul studenţilor pentru înţelegerea proceselor biologice - normale şi patologice - predate la disciplinele clinice.

În egală măsură şi manualele de biochimie medicală utilizate de studenţii medicinişti din anul I îndeplinesc aceste deziderate. Cum însă procesele biologice, normale şi patologice, precum şi bogata cazuistică întâlnite la disciplinele clinice sunt foarte variate, ele nu pot fi înţelese şi asimilate decât făcându-se apel la integrarea multor noţiuni acumulate pe parcursul învăţământului predat anterior. Realizarea unei asemenea integrări, din punct de vedere biochimic, o face în mare măsură prezentul tratat de *Biochimie clinică (Patochimie)*.

Pe baza unui plan logic întocmit de autori, manualul tratează cele mai importante probleme cu caracter biochimic care trebuie să facă parte din bagajul de cunoştinţe al medicului clinician. Astfel, primul capitol este consacrat „laboratorului clinic considerat drept sursă informaţională medicală de bază". Apoi, în scopul prezentării - din aproape în aproape - a proceselor biochimice normale şi patologice desfăşurate în organism se reamintesc datele esenţiale referitoare la celulă şi la principalii ei constituenţi de interes biochimic. În continuare sunt readuse în memorie marile metabolisme care se stabilesc în mediul intern pentru asigurarea homeostaziei. Ulterior, după prezentarea amănunţită a componentelor sanguine şi a rolurilor pe cale le

îndeplinesc, sunt descrise pe larg cele mai importante fenomene patochimice care stau la baza multor maladii. În acest cadru sunt prezentate - în primul rând - procesele patochimice implicate în tulburările imunitare, apoi sunt tratate cele desfăşurate la nivelul aparatelor şi sistemelor din organism, iar ultimul capitol este consacrat patochimiei cancerului.

În ansamblu, caracterul acestei lucrări este atât didactic cât şi formativ, deoarece prin cuprinsul său se urmăreşte, pe de o parte, pregătirea viitorilor medici, iar pe de altă parte documentarea suplimentară a medicilor formaţi, practicieni cu diverse specialităţi. Privit sub acest ultim aspect, tratatul conţine un material vast, însă deosebit de util pentru fundamentarea întregului act medical: de la înţelegerea etiologiei bolilor şi până la dirijarea spre alegerea tratamentelor moderne cele mai adecvate.

Totodată acest manual reprezintă un ajutor preţios pentru instruirea personalului calificat (medici, biologi, chimişti) care activează în laboratoarele clinice şi de a cărui competenţă în efectuarea analizelor depinde stabilirea diagnosticului şi a tratamentului prescris de clinician.

În sfârşit, este de remarcat că tratarea sub aspect strict medical a biochimiei se completează armonios în lucrarea de faţă cu prezentarea unora din cele mai noi achiziţii ştiinţifice de investigaţie medicală. Acest fapt relevă, o dată în plus, valoarea deosebită a prezentului tratat de *Biochimie clinică (Patochimie)*.

Profesor dr. docent Aurora Popescu

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ

INTRODUCERE

Medicina clasică a descris şi a clasificat bolile pe baza semnelor sau simptomelor lor perceptibile, adică pe baza unor criterii fenomenologice. În urma dezvoltării şi perfecţionării substanţiale a mijloacelor tehnice de investigaţie, şi în primul rând a microscopiei, din secolul al XVIII-lea s-au formulat principiile morfologice ale medicinei. Aplicarea în practică a acestora a dus la realizarea şi în acest domeniu a unor progrese însemnate, exacte, fondate ştiinţific.

Puterea de rezoluţie a microscopului optic este însă limitată la lungimile de undă ale luminii vizibile. Din această cauză, obiecte cu dimensiuni sub 400 nm nu pot fi identificate microscopic. Deşi prin folosirea fasciculelor de electroni rezoluţia microscopului electronic a putut fi mărită de circa 500 de ori, din cauza construcţiei tehnice complicate, precum şi din motive financiare, acest mijloc de explorare morfologică nu a putut fi răspândit în practica medicală. Totuşi, pe planul cercetărilor fundamentale, microstructurile celulare, funcţiile normale şi patologice legate de acestea, au fost descoperite, respectiv deduse cu ajutorul microscopiei electronice. Ca urmare, s-a format şi concepţia după care fenomenele vieţii se manifestă la nivelurile bine definite ale structurilor celulare moleculare şi sunt caracterizate în primul rând pe plan biochimic. Astfel, şi medicina modernă, considerată ca o patologie biochimică sau patochimie moleculară, este caracterizată, în primul rând, de transformările biochimice manifestate pe planul microstructurilor celulare.

Schimburile informaţiilor interdisciplinare reprezintă o necesitate indispensabilă şi în domeniul ştiinţelor biologice. Folosirea reciprocă a cuceririlor diferitelor ramuri de ştiinţă este însă îngreunată prin marea varietate a acestora, precum şi prin cunoaşterea deficitară de către beneficiari a limbajului profesional deosebit al specialităţilor respective. Astfel, cărţile de biochimie medicală, care, prezintă evident date autentice din domeniul medical, sunt scrise în limbajul profesional particular al biochimiştilor. Din acest motiv, conţinutul lor informaţional devine în marea lui majoritate mai dificil, prea specializat tocmai pentru acei medici practicieni, care prezintă nevoia maximă faţă de aceste informaţii.

Se conturează deci necesitatea stringentă a apariţiei unui material documentar medical, care să rezolve acest impediment, prin prezentarea cuceririlor fundamentale ale biochimiei moleculare normale şi patologice într-un limbaj folosit curent, dar în acelaşi timp şi perfect ştiinţific. Necesitatea irealizabilă de a cunoaşte în mod enciclopedic întregul tezaur ştiinţific al disciplinelor înrudite este deci şi trebuie să fie substituită în mod real prin obligaţia de a fi bine informat în aceste domenii. O încercare de acest gen este şi acest tratat de *Biochimie clinică (Patochimie)* (biochimie pentru medici), pe care îl recomandăm cu căldură, atât studenţilor în medicină, cât şi medicilor practicieni, precum şi tuturor acelora interesaţi de studiul organismului uman.

Acad. Prof. Dr. Eugen Módy

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITARĂ

1 Laboratorul de analize medicale, sursa informațională medicală de bază

1.1. Sistemul internaţional al unităţilor de măsură 2
1.2. Criteriile de calitate ale analizelor de laborator 5
1.3. Controlul intern de calitate al analizelor de laborator 6

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În observarea simptomelor bolilor şi în stabilirea diagnosticului acestora, la început şi de-a lungul mileniilor, medicii s-au putut baza exclusiv pe informaţiile culese cu ajutorul organelor lor de simţ. În zilele noastre, în laboratoarele de analize medicale, pentru acest scop stau la dispoziţie o aparatură şi o metodologie din ce în ce mai variate, exacte şi precise.

Analizele de laborator, referitoare la evidenţierea modificărilor patologice ale diferiţilor parametri, respectiv activităţi din organism, reprezintă cca 80% din explorările paraclinice efectuate. Ca urmare, laboratorul clinic a devenit fără îndoială, sursa informaţională principală a practicii medicale.

În această calitate însă, laboratorul medical trebuie să satisfacă următoarele două criterii. Pe de o parte, să-şi exprime valorile obţinute în unităţi de măsură unitare şi standardizate pe plan internaţional, iar pe de altă parte, să furnizeze date, care să reflecte situaţii reale, cu o maximă exactitate şi precizie.

Partea obiectivă a acestor condiţii fundamentale o constituie existenţa şi utilizarea unităţilor de măsură standardizate în cadrul Sistemului Internaţional al acestora (S.I.), precum şi funcţionarea zilnică a unui control intern de calitate în fiecare laborator de analize medicale.

Partea subiectivă este realizată prin utilizarea corectă a datelor de laborator, ceea ce înseamnă prelucrarea şi folosirea lor, sub prisma cunoaşterii cât se poate de substanţiale şi autentice a structurilor şi mecanismelor legate de aceste date.

Ca urmare, valoarea informaţională reală a datelor de laborator se manifestă nu numai în cunoaşterea, dar şi în interpretarea lor corectă.

1.1. Sistemul internațional al unităților de măsură

Sistemul internaţional (S.I.) a fost adaptat la a 11-a Conferinţă Generală de Măsuri şi Greutăţi din 1960 şi cuprinde unităţi de bază, unităţi suplimentare şi unităţi derivate.

Unităţile de bază sunt prezentate în tabelul 1.

Unităţile suplimentare pot fi considerate ca făcând parte fie din cele de bază, fie din cele derivate (unghi plan, unghi solid).

Unităţile derivate sunt unităţi exprimate algebric în termeni de unităţi de bază şi/sau unităţi suplimentare. Simbolurile lor se obţin cu ajutorul semnelor matematice ale înmulţirii şi ale împărţirii.

BCU CENTRALĂ

Tabelul 1

Unităţile de bază ale sistemului internaţional

	S.I.	Simbol
lungime	m	m
masă	kg	kg
timp	sec	s
curent electric	amper	A
temperatură termodinamică	kelvin	K
cantitate de substanţă	mol	mol
intensitate luminoasă	candela	od

Parte din unităţile derivate există ca numiri şi simboluri speciale (tabelul 2).

Prefixele pentru a forma nume şi simboluri ai multiplilor unităţilor S.I. (multiplii decimali şi submultiplii) sunt date în tabelul 2.

Tabelul 2

Nume speciale şi simboluri ale unităţilor derivate S.I.

	S.I.	Simbol	Exprimarea în termeni de bază sau suplimentari, sau în alţi derivaţi ai S.I.
frecvenţă	hertz	Hz	$1\ Hz = 1\ s^{-1}$
forţă	newton	N	$1\ N = 1\ kg\ m/s^2$
presiune	pascal	Pa	$1\ Pa = 1\ N/m^2$
energie, cantitate de căldură	joule	J	$1\ J = 1\ N \cdot m$
putere	watt	w	$1\ w = 1\ J/s$
încărcătură electrică cantitate de electricitate	coulomb	C	$1\ C = 1\ A \cdot s$
potenţial electric, diferenţă de potenţial, tensiune, forţă electromotoare	volt	V	$1\ V = 1\ J/C$
capacitate electrică	farad	F	$1\ F = 1\ C/V$
rezistenţă electrică	ohmi	Ω	$1\Omega = 1\ V/A$
conductanţă electrică	siemens	S	$1\ S = 1\Omega^{-1}$
fluxul inductanţei magnetice, flux magnetic	weber	Wb	$1\ Wb = 1\ V \cdot s$
densitatea fluxului magnetic, inducţia magnetică	tesla	T	$1\ T = 1\ Wb/m^2$
inductanţa	henry	H	$1\ H = 1\ Wb/A$
flux luminos	lumen	lm	$1\ lm = 1\ cd \cdot sr$
iluminare	lux	lx	$1\ lx = 1\ lm/m^2$

În afara S.I. există anumite unităţi care sunt recunoscute totuşi de către Comitetul Internaţional de Măsuri şi Greutăţi datorită importanţei lor practice (tabelul 4) sau utilizării lor în domenii speciale (tabelul 5). Prefixele din tabelul 3 se pot ataşa la multe din unităţile date în tabelele 4 şi 5 (de exemplu mililitru, ml).

Tabelul 3

Prefixele S.I.

Factorul prin care unitatea este multiplicată	Prefix	
	Nume	Simbol
10^{12}	tera	T
10^{9}	giga	G
10^{6}	mega	M
10^{3}	kilo	K
10^{2}	hecto	h
10	deca	da
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mili	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a

Tabelul 4

Unităţi de importanţă practică în afara S.I.

	Numele unităţii	Simbol	Definire
timp	minut oră zi	min h d	1 min = 60 s 1 h = 60' 1 d = 24 h
unghi plan	grad minut secundă	0 ' "	1° = (n/180) rad 1' = (1/60)° 1" = (1/60)'
volum	litru	l	1l = 1 dm^3
masă	tonă	t	1 t = 10^3 kg

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 5

Unităţi în afara S.I. utilizate în domenii speciale

	Numele unităţii	Simbol	Definiţie
energie	electron volt	ev	$1 \text{ ev} = 1{,}60219 \cdot 10^{-19}$
masă atomică	unitate de masă atomică(aprox.)	η	$1\ \eta = 1{,}66053 \cdot 10^{21}$
lungime	unitate astronomică	AU	$1 \text{ Au} = 149600 \cdot 10^{6}\text{m}$
	parsec	ps	$1 \text{ ps} = 206265 \text{ AU} = 30857 \cdot 10^{12}\text{m}$

1.2. Criteriile de calitate ale analizelor de laborator

Criteriul fundamental al autenticităţii datelor de laborator îl constituie exactitatea şi precizia lor. Aceste două criterii sunt însă mai mult sau mai puţin influenţate de erorile făcute în cursul determinărilor manuale sau instrumentale. Pe baza unor criterii cauzale, erorile pot fi de trei feluri:

a) erori sistemice legate de aparatură, de curentul electric, de calitatea reactivilor folosiţi, de temperatura ambiantă etc., care sunt relativ constante şi se manifestă în tot cursul măsurătorilor;

b) erori ocazionale, individuale, condiţionate de predispoziţia momentană, experienţă etc., care sunt mai mult sau mai puţin variabile;

c) erori grosolane cauzate de factori incompatibili cu activitatea în laboratoare, ca nepriceperea profesională, nerespectarea prescripţiilor, mânuirea incorectă a instrumentelor etc.

Exactitatea exprimă gradul de apropiere a valorii medii ($\bar{x}$) obţinute în urma determinărilor paralele, efectuate din aceeaşi probă, de valoarea exactă, reală. Valoarea medie se calculează prin împărţirea la numărul analizelor efectuate (n) a sumei valorilor individuale ($\sum x_i$):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Cu cât cele două valori se apropie mai mult între ele, cu atât metoda utilizată este mai exactă. Exactitatea metodelor de laborator este condiţionată de felul şi dimensiunile erorilor sistemice.

Precizia înseamnă gradul de oscilare, adică *dispersia valorilor individuale* (x_i) în jurul valorii medii ($\bar{x}$), dintr-o serie de determinări paralele, efectuate din aceeaşi probă, în cazurile în care modificările întâmplătoare ale acestor

valori corespund unei distribuţii normale, adică ele pot fi aşezate de-a lungul unei curbe simetrice, sub formă de clopot, descrisă de Gauss. Această oscilare este cauzată de *erorile individuale*, ocazionale, ce se manifestă în tot cursul efectuării determinărilor, inclusiv prepararea şi folosirea reactivilor, mânuirea individuală a instrumentelor etc. Gradul dispersiei, adică valoarea absolută a diferenţelor între valoarea individuală minimă şi maximă, se exprimă prin valoarea cifrică a erorii standard sau deviaţiei standard (s). Această valoare se calculează din rădăcina pătrată a pătratului sumei diferenţelor valorilor individuale (x_i) şi a valorii medii ($\bar{x}$), împărţită la numărul probelor efectuate, minus unu (n-1), conform formulei următoare:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Valoarea cifrică a erorii standard (s) este deci direct proporţională cu gradul dispersiei şi invers proporţională cu precizia metodei: cu cât valoarea cifrică a erorii standard (s) de la o metodă oarecare este mai mică, cu atât metoda este mai precisă.

Coeficientul de variabilitate este expresia procentuală a deviaţiei standard (s), în raport cu valoarea medie ($\bar{x}$) şi indică abaterea procentuală faţă de aceasta în sus şi în jos a gradului dispersiei, conform formulei:

$$V = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \%$$

De exemplu, în cazul unei valori medii de 100 U şi al unui coeficient de variabilitate de 10%, dispersia valorilor individuale (x_i) este admisă între ±10%, adică între 90-110 U, ceea ce reprezintă limitele inferioară şi superioară intervalului considerat normal. Pentru determinările efectuate în laboratoarele medicale, valoarea admisă a coeficientului de variabilitate este sub 10%, în unele cazuri chiar sub ±5%.

Pe baza criteriilor de mai sus, metodele analitice folosite în laboratoarele medicale pot fi clasificate în patru grupe, exprimate grafic în figura 1.

1.3. Controlul intern de calitate al analizelor de laborator

În cursul instalării *controlului intern de calitate* într-un laborator, ca prim pas *se aleg metodele potrivite*, pe baza criteriului de exactitate. În faza următoare se stabileşte precizia metodei, prin fixarea celor două limite, inferioară şi superioară, stabilite prin multiplicarea cu 3 a valorii deviaţiei standard (s), situate între limitele ±3s. În acelaşi timp, în cadrul acestor limite, valoarea coeficientului de variabilitate (V) trebuie să fie inferioară valorii de ±5-10%.

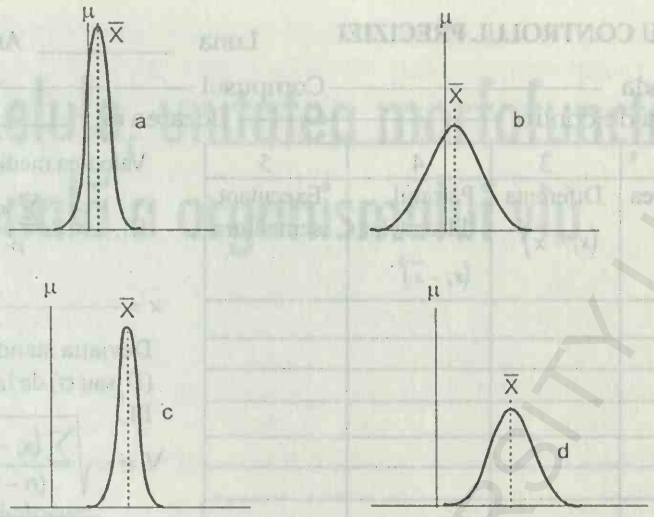


Fig. 1. Reprezentarea grafică a criteriilor de exactitate şi precizie ale analizelor de laborator: a) metodă exactă şi precisă; b) metodă exactă şi imprecisă; c) metodă inexactă şi precisă; d) metodă inexactă şi imprecisă.

În faza finală, la fiecare serie zilnică de analize se adaugă câte o *probă de control*, având concentraţia cunoscută a substanţei respective. Valorile obţinute zilnic ale acestei probe de control se trec pe o foaie milimetrică, pe care printr-o linie dreaptă în mijloc se indică valoarea medie, iar deasupra şi dedesubtul acesteia, cele două linii corespunzătoare valorilor +3s şi -3s. În cazul în care valoarea găsită la această probă de control va fi mai mare, sau mai mică decât limitele superioare (+3s) sau inferioare (-3s) admise, această deviere pledează pentru existenţa unei erori sistemice sau ocazionale, din care cauză seria respectivă de analize se situează *în afară de control*. De aceeaşi însemnătate sunt şi tendinţele de creştere sau scădere succesivă ale valorilor zilnice ale probei de control. Ca urmare, nici valorile individuale ale probelor propriu-zise din seria respectivă nu corespund realităţii şi nu pot fi eliberate. În vederea remedierii greşelii, se trece imediat la descoperirea şi eliminarea sursei sau a surselor de eroare, după care se repetă seria de determinări şi se eliberează rezultatele corespunzătoare. Fişa de control, cu semnele erorilor posibile, este prezentată în figura 2.

Rezultatele unor analize efectuate în alte laboratoare şi cu alte metode, pot fi utilizate numai în cazul în care acestea corespund în întregime criteriilor de exactitate şi precizie. Este deci o necesitate obiectivă folosirea metodelor de laborator standardizate şi controlate pe plan naţional şi internaţional, precum şi funcţionarea unui sistem de control intern de calitate, cu efectuarea reciprocă a unor dozări de substanţe din aceeaşi probă de către diferite laboratoare. Pentru scopul orientărilor urgente se utilizează *teste rapide calitative*, dar şi cantitative (Reflotron), în special în cadrul unor examinări în masă (screening). Exactitatea şi precizia acestor analize rămâne însă mult inferioară celor standardizate.

FIŞA PENTRU CONTROLUL PRECIZIEI Luna _____ Anul _____

Metoda _____ Compusul _____

Proba de control _____ Dozarea nr _____

1	2	3	4	5
Ziua	Valoarea găsită	Diferenţa $(x_i - \bar{x})$	Pătratul diferenţelor $(x_i - \bar{x})^2$	Executant semnătura
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

I. $\boxed{\sum x_i =}$

II. $\boxed{n =}$

IV. $\boxed{\sum (x_i - \bar{x})^2 =}$

Valoarea medie

III. $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{\text{I}}{\text{II}}$

$\bar{x} =$ _____ $=$ III

Deviaţia standard (D_s sau σ) de la zi la zi

III.

V. $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{IV}{n-1}}$

$\sigma = \sqrt{\text{\_\_\_\_\_}}$

$\sigma = \sqrt{\text{\_\_\_\_\_}}$

$\sigma =$ _____ V.

Coeficientul de variaţie

VI. $C_v(\%) = \frac{\sigma \cdot 100}{\bar{x}} = \frac{v \cdot 100}{\text{III}}$

$C_v(\%) =$ _____ $\cdot 100 =$

$=$ _____ VI.

Limitele de control

VII. superioară

$\bar{x} \neq 3\sigma =$

$=$ _____ VII.

VIII. inferioară

$\bar{x} - 3\sigma =$

$=$ _____ VIII.

Calculat la _____ 19 ____ de _____ semnătura _____

Fig. 2. Fişa de control pentru înregistrarea zilnică a valorilor probei de control, la o metodă cantitativă oarecare, în cadrul limitelor de eroare admise între ±3s.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2 Celula, unitatea morfofuncțională a organismului viu

2.1. Spaţiul biologic 11
2.2. Timpul biologic 12
2.3. Bioenergetica. Cataliza enzimatică. 13
2.4. Membrana celulară 15
2.4.1. Structura membranei 17
2.4.2. Lipidele din membrană 18
2.4.3. Proteinele din membrană: glicoproteinele şi lipoproteinele . 20
2.5. Citoplasma 26
2.6. Structura şi funcţiile microorganitelor celulare: lizozomii, ribozomii, mitocondriile, aparatul Golgi, microcentrul 29
2.6.1. Lizozomii 29
2.6.2. Ribozomii 31
2.6.3. Mitocondriile 32
2.6.4. Aparatul Golgi 33
2.7. Nucleul celular 35
2.7.1. Structura nucleului celular 35

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

BCU IAȘI / TRADITIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Substanţele anorganice şi organice sunt alcătuite din aceleaşi elemente componente; totuşi în compoziţia chimică a biostructurilor figurează cu precădere următoarele elemente: C, H, O, N, S şi P. Dincolo de compoziţia elementară, microstructura biochimică a sistemelor vii este realizată de apă, săruri minerale şi diferite biomolecule: proteine, glucide, lipide, acizi nucleici şi combinaţiile acestora. Studiul şi caracterizarea acestor microstructuri intră în domeniul mecanicii chimice sau al biochimiei descriptive. Întrucât folosirea utilă în practică a cunoştinţelor legate de substanţele din organism nu este condiţionată de cunoaşterea exactă a structurii lor chimice, în cele ce urmează se vor face referiri în special la aspectele funcţionale ale biomaterialelor, prezentând formulele lor chimice numai în cazul în care aceasta va fi absolut necesar (fig. 3).

La rândul lor aceste biostructuri prezintă o serie de particularităţi comune:

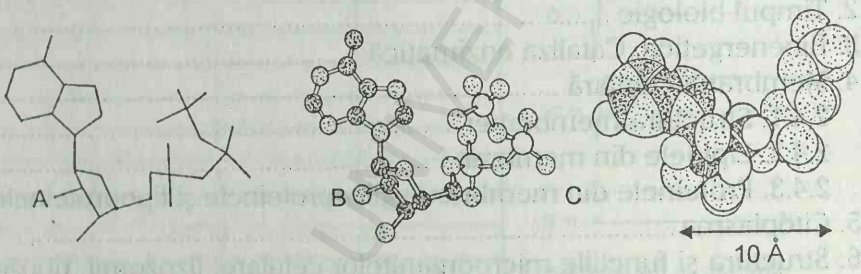


Fig. 3. Modelele formulelor structurale, cu beţe şi sfere, precum şi cu umplerea spaţiului unei molecule de ATP.

a) Biostructurile sunt alcătuite din constituenţi mai simpli numiţi monomeri, cuplaţi între ei sub formă de polimeri, care se unesc şi se organizează în diferite spaţii delimitate, numite compartimente intracelulare. Această integrare structurală multistratificată duce la formarea unor sisteme moleculare microscopice şi macroscopice ordonate.

b) Biostructurile de diferite niveluri sunt indisolubil legate de funcţiile biologice corespunzătoare, care se manifestă în mod similar prin asamblarea funcţiilor elementare ale monomerilor. Această asamblare însă se realizează pe baza principiului de cooperare, ceea ce înseamnă că un polimer are totdeauna capacitatea funcţională mult mai mare decât suma algebrică a funcţiilor individuale ale monomerilor constituenţi.

c) Formarea, menţinerea şi funcţionarea structurilor ordonate în sistemul viu deschis al vieţuitoarelor se realizează printr-un aport continuu de energie din exterior, utilizată cu ajutorul reacţiilor.

TIPURILE DE ORGANISME. În funcţie de gradul de organizare, vieţuitoarele fac parte din următoarele categorii:

I. **Procariote**: organisme lipsite de nucleu. Din această categorie fac parte bacteriile cu două linii de dezvoltare: a) arhebacteriile şi b) eubacteriile.

II. **Eucariote**: organisme cu nucleu, care includ plantele şi animalele, ca şi organismele unicelulare ca: amoeba, alge, fungi şi mucegaiuri.

III. **Virusuri**: organisme obligatoriu parazite celular, care solicită o celulă gazdă pentru a supravieţui. Virusurile bacteriilor sunt numite bacteriofagi.

Deşi eucariotele sunt diferite structural de procariote, ele au multe trăsături biochimice comune. Deoarece bacteriile sunt cauza majoră a bolilor este important să cunoaştem deosebirile lor biochimice structurale faţă de eucariote.

Trăsături esenţiale	Procariote	Eucariote
Nucleul, nucleolul şi organelele	absente	prezente
Informaţia genetică	Un singur cromozom O singură moleculă de ADN şi proteinele asociate, care conţin multe gene.	cromozomi multipli
Diviziune celulară	Clivaj	Mitoză şi meioză
Sinteza de proteine	Cuplată cu transcripţie în nucleu în acelaşi compartiment şi translat în citoplasmă.	ARN sintetizat
Metabolism	anaerob şi aerob	aerob
Enzimele respiratorii	Membrana plasmatică	Mitocondrie
Peretele celular	prezent	matrice extracelulară
Citoscheleton	absent	prezent
Endocitoza şi exocitoza	absente	prezente

2.1. Spaţiul biologic

Spaţiul biologic este realizat de întregul volum ocupat de totalitatea micro- şi macrostructurilor. Începând cu dimensiunile atomilor de 0,1 nm (1 Å = Angström) până la limita vizibilităţii cu microscopul optic (1 μm = 10^5Å = 10^4nm),

dimensiunile mărimilor măsurabile cresc de 100 000 de ori. Spaţiul ocupat de diferite biomolecule variază între câţiva nm şi câteva sute de nm. Masele atomilor şi moleculelor se măsoară în daltoni (1d = masa atomului de hidrogen sau 1/16 din masa atomului de oxigen). Masa moleculară a apei este de 18 d, a ureei de 30 d, a glucozei de 180 d, a hemoglobinei de 68 000 d (68 Kd) etc. Nucleoproteinele macromoleculare au mase moleculare de mai multe milioane d. Diametrul moleculei de hemoglobină este de 6,5 nm, cel al unor particule virale se situează între 10-100 nm, iar diametrul unor procariote (microbi) este de 1-2 μm. Spre deosebire de biosinteza moleculelor mici, care este totdeauna un proces consumator de energie, formarea macromoleculelor se desfăşoară în marea majoritate a cazurilor prin autoansamblare spontană a unor monomeri fără aport energetic considerabil (fig. 4).

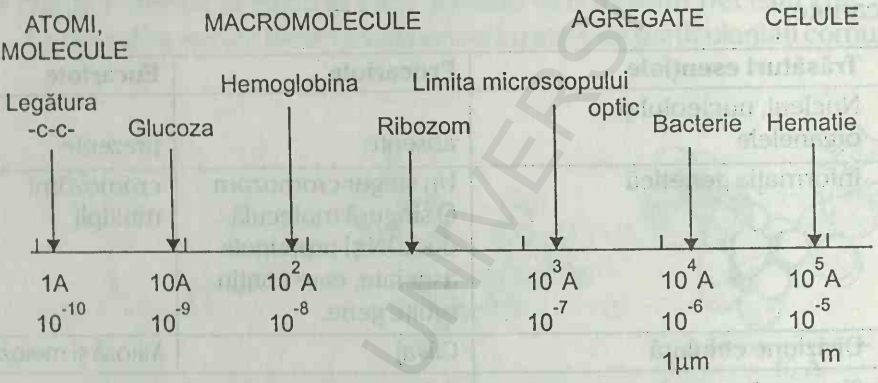


Fig. 4. Scara dimensiunilor în spaţiu ale unor biostructuri.

2.2. Timpul biologic

Desfăşurarea transformărilor şi interacţiunilor localizate în spaţiul biologic este limitată şi în timp. Viteza de reacţie a transformărilor biochimice, în condiţii izotermice, este condiţionată în primul rând de cantitatea existentă a partenerilor de reacţie. Paralel cu scăderea concentraţiei locale a acestora, scade şi viteza transformărilor respective. În cazul unor concentraţii intracelulare extrem de reduse, transformările nu mai au loc şi partenerii de reacţie intră în stare de metastabilitate. În ciuda acestei metastabilităţi, transformările biochimice se desfăşoară totuşi datorită activităţii biocatalitice a enzimelor. Viteza reacţiilor biochimice intracelulare poate fi de ordinul milisecundelor (msec), în unele cazuri chiar şi al μsec. De exemplu o porţiune dublu spiralată de ADN, la nivelul unei gene activate, se despiralează în câteva μsec, iar biosinteza celor două perechi de lanţuri peptidice grele din molecula imunoglobulinei, inclusiv cuplarea lor prin punţi disulfidice în citoplasma unui plasmocit, durează 60 de sec. În schimb, absorbţia unui foton dintr-o celulă cu conuri din retină se desfăşoară în câteva psec (10^{-12} sec) (fig. 5).

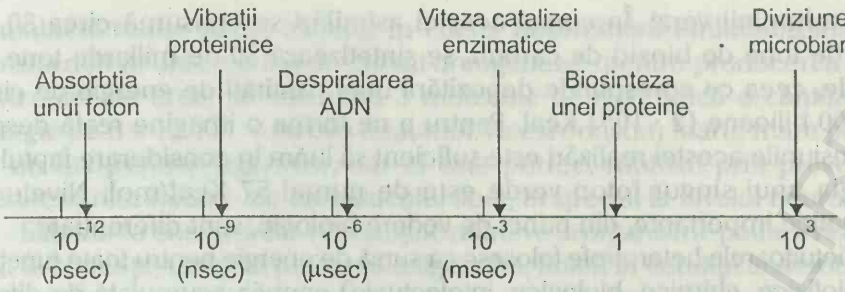


Fig. 5. Scara desfășurării în timp a unor reacții chimice de importanță biologică.

2.3. Bioenergetica. Cataliza enzimatică

Structurile ordonate şi funcţiile complexe ale sistemelor vii pot fi create şi menţinute numai pe seama unui aport continuu de energie. Dat fiind că energia este definită drept capacitatea de a realiza un travaliu, primul principiu al termodinamicii (R. Mayer, 1848) postulează că toate formele de energie pot fi transformate între ele, fără pierdere, dar şi fără câştig de energie.

Principiul al doilea al termodinamicii (R. Clausius, 1857) stabileşte conţinutul energetic al tuturor sistemelor care se compun din două părţi: a) energia liberă, utilizabilă şi b) entropia sau acea parte a energiei, care în cursul schimbărilor se transformă în mod obligatoriu în căldură. În cursul transformărilor energetice, cantităţile de energie se echilibrează. Paralel cu această echilibrare, cantitatea de energie liberă scade, în timp ce entropia creşte. Din acest motiv, fără un aport continuu de energie, nici un sistem nu poate fi menţinut în funcţie. Ca urmare, construirea unui perpetuum mobile este absolut imposibilă. Scopul eliberării continue a energiei în sistemele vii îl constituie tocmai realizarea acelei condiţii, ca în locul manifestării tendinţei spontane de instalare a unei dezordini structurale şi funcţionale (caracterizată prin creşterea entropiei) să se manifeste tocmai contrariul acesteia, adică menţinerea sau chiar creşterea caracterului ordonat al sistemului prin scăderea entropiei. Această stare poate fi realizată şi menţinută numai dacă entropia mediului creşte paralel, în egală măsură. Acest principiu a fost formulat de Erwin Schrödinger în felul următor: organismele vii sustrag din mediul lor entropie negativă.

Sursa de energie care asigură existenţa vieţii pe pământ o constituie energia radiaţiei solare. Prin aceasta, ajunge anual pe suprafaţa pământului o cantitate de energie egală cu cea de 50 000 trilioane (5×10^{20}) Kilocalorii (Kcal). Din această cantitate plantele autotrofe absorb prin clorofila frunzelor numai circa 1%, adică în mod exclusiv energia fotonilor cu lungimea de

undă a luminii verzi. În cursul acestei asimilări se consumă circa 80 de miliarde tone de bioxid de carbon, se sintetizează 50 de miliarde tone de glucide, ceea ce corespunde depozitării unei cantităţi de energie de circa 200 000 bilioane ($2 \cdot 10^{17}$) Kcal. Pentru a ne forma o imagine reală despre dimensiunile acestei realizări este suficient să luăm în considerare faptul că energia unui singur foton verde este de numai 57 Kcal/mol. Nivelurile energetice importante, din punct de vedere biologic, sunt diferenţiate.

Vieţuitoarele heterotrofe folosesc ca sursă de energie pentru toate funcţiile lor (biofizice, chimice, biologice, intelectuale) energia acumulată de diferiţi carburanţi purtători de energie, substanţe nutritive. În cursul transformării biochimice, substanţa nutritivă coboară de la nivelul energetic înalt la nivelul energetic mult mai scăzut al produsului de degradare şi pune în libertate cantitatea de energie care corespunde diferenţei dintre cele două niveluri. Aceste reacţii chimice se numesc exergonice, spre deosebire de cele endergonice, ale căror produse ajung de la nivelul energetic mai scăzut al substratului, la un nivel energetic mult mai ridicat, pe seama unui consum de energie în cursul transformărilor. Spre deosebire de legăturile chimice simple, cu un conţinut energetic sub 3000 Kcal/mol, energia acumulată în legăturile chimice numite macroergice se situează între 7 000-12 000 Kcal/mol. Biomoleculele care conţin legături chimice macroergice ca adenozintrifosfatul (ATP) şi analogii săi (ITP, UTP, GTP), creatinfosfatul (CP), fosfoenolpiruvatul (PEP), acil-coenzima A (AcCoA) etc., reprezintă o formă de depozitare biologică deosebită a energiei, deoarece prin simpla descompunere a legăturii macroergice, energia depozitată se pune în libertate şi poate fi utilizată în orice scop şi formă. O particularitate esenţială a proceselor vitale constă în faptul că pe de o parte, în cursul metabolismului energia carburanţilor nu se eliberează dintr-o dată ci în trepte (cuante) şi pe de altă parte, înainte de a fi utilizată energia eliberată se depozitează sub forma uşor accesibilă a legăturilor chimice macroergice.

Conform teoriei cinetice a materiei, constituenţii elementari ai atomilor şi moleculelor, ca şi atomii şi moleculele se află în continuă mişcare. Nevoia energetică medie a acestei mişcări termice, dependentă de temperatura ambiantă este de circa 0,6 Kcal/mol, la temperatura de 25°C. Absorbţia acestei cantităţi de energie nu produce nici o modificare a proprietăţilor fizice şi chimice ale particulelor prezente. Pentru producerea unor asemenea modificări sunt necesare cantităţi mult mai mari de energie. De exemplu, scindarea unei legături chimice covalente între 2 atomi de carbon (-C-C) poate fi realizată pe seama unui consum energetic de 83 Kcal/mol. Structura substratelor organice care conţin legături covalente (aminoacizi, glucide, lipide) este deosebit de stabilă şi atât biosinteza, cât şi descompunerea lor metabolică se realizează prin intervenţia enzimelor ca biocatalizatori.

Realizarea unor transformări metabolice neeconomice (consumatoare de energie), dar care sunt de importanţă vitală pentru organism, devine posibilă tot prin folosirea energiei depozitate. Un exemplu bun al acestor transformări îl constituie ureogeneza localizată în hepatocite, prin care

amoniacul foarte toxic, eliberat în cursul dezaminării aminoacizilor, este transformat în uree neutră. În cursul ureogenezei, pentru producerea fixării moleculei de uree, se consumă 3 molecule de ATP, adică o cantitate de energie de 3 × 12 000 = 36 000 Kcal/mol. Acest consum foarte mare pare să fie un lux pentru organism, dar el este perfect motivat prin prevenirea manifestărilor nocive ale amoniacului liber, în special la nivelul neuronilor.

Eliberarea energiei din substanţele nutritive în organisme poate fi realizată atât în absenţa, cât şi în prezenţa oxigenului, adică în condiţii anaerobe sau aerobe. În motoarele cu ardere internă reacţia furnizoare de energie o constituie producerea de bioxid de carbon prin arderea carburanţilor. Spre deosebire de aceasta, în cursul oxidărilor biologice, bioxidul de carbon se formează prin simpla decarboxilare a unor acizi organici, fără punerea în libertate a unor cantităţi considerabile de energie. Sursa propriu-zisă a energiei necesară vieţii o constituie arderea hidrogenului sustras din moleculele carburanţilor prin dehidrogenări enzimatice, în prezenţa oxigenului atmosferic, transportat de hemoglobină la celule.

2.4. Membrana celulară

Celulele organismelor eucariote sunt înconjurate de o membrană plasmatică complexă (membrana celulară, sau plasmalema) (fig. 6). Această membrană este o limită semipermeabilă între celulă şi mediul extern, sau

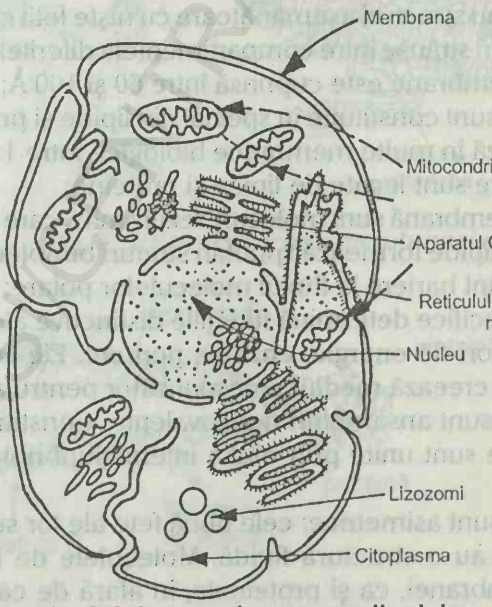


Fig. 6. Schema microstructurii celulare.

între celulele învecinate din organism, care permite unor substanţe să treacă prin ea de la exterior şi să păstreze alţi constituenţi în celulă.

Membrana semipermeabilă are un rol esenţial în controlul compoziţiei citoplasmei. Apa, ionii şi metaboliţii cu greutate mică (cum este glucoza) trec prin membrana plasmatică într-un mod controlat. Pentru internalizarea macromoleculelor, celula foloseşte alte mecanisme: endocitoza — un proces prin care celula înglobează materialul extracelular prin invaginarea membranei plasmatice. Celulele eucariote conţin de asemenea membrane interne, care formează limitele organitelor: mitocondrii, cloroplaste şi lizozomi. Specializarea funcţională în cursul evoluţiei a fost strâns legată de formarea acestor compartimente. Membranele controlează fluxul informaţiei dintre celulă şi mediul înconjurător; ele conţin receptori specifici pentru stimulii externi. Mişcarea bacteriei spre hrană, răspunsul celulelor ţintă la hormoni ca insulina şi percepţia luminii, sunt procese în care evenimentul primar este detectarea semnalului de către receptorii specifici de membrană. La rândul lor, unele membrane generează semnale, care pot fi de natură chimică sau electrică. În acest caz membranele joacă un rol central în comunicarea biologică. Cele două procese importante de convertire ale energiei în sistemele biologice (fotosinteza şi fosforilarea oxidativă) sunt îndeplinite de sistemele de membrană, care conţin centre de coordonare ale enzimelor şi ale altor proteine. Fotosinteza, proces în care lumina este convertită în legături chimice înalt energetice, se produce în membranele interne ale cloroplastelor, în timp ce fosforilarea oxidativă, în care adenozintrifosfatul (ATP) este format prin oxidarea moleculelor, are loc în membrana internă a mitocondriei. Membranele sunt diverse ca structură şi funcţie şi au un număr de trăsături importante:

a) Membranele au structuri asemănătoare cu nişte folii cu grosime mică, ce formează delimitări strânse între compartimentele diferitelor componente. Grosimea multor membrane este cuprinsă între 60 şi 100 Å;

b) Membranele sunt constituite în special din lipide şi proteine. Raportul lipide/proteine variază în multe membrane biologice între 1:4 şi 4:1. Ele mai conţin şi glucide, care sunt legate de lipide şi proteine;

c) Lipidele de membrană sunt molecule relativ mici, care au părţi hidrofile şi hidrofobe. Aceste lipide formează spontan straturi bimoleculare strânse în mediul apos, care sunt bariere la fluxul moleculelor polare;

d) Proteinele specifice determină funcţiile distinctive ale membranelor: receptori, transmiţători de energie, enzime, pori etc. Ele sunt îngropate în bistratul lipidic, care creează mediul corespunzător pentru activităţile lor;

e) Membranele sunt ansambluri noncovalente. Constituentul proteic şi moleculele de lipide sunt unite prin multe interacţiuni noncovalente, care sunt cooperante;

f) Membranele sunt asimetrice: cele două feţe ale lor sunt diferite;

g) Membranele au o structură fluidă. Moleculele de lipide difuzează rapid în planul membranei, ca şi proteinele, în afară de cazul în care sunt

ancorate prin interacţiuni specifice. Membranele pot fi privite ca soluţii bidimensionale de proteine şi lipide orientate.

2.4.1. Structura membranei

Prin tehnici speciale de mare acurateţe ca îngheţare foarte rapidă în azot lichid şi apoi fracţionare în vid, urmată de vizualizarea la microscopul electronic, a fost pusă în evidenţă structura membranei.

Membranele sunt straturi bimoleculare fosfolipidice cu încrustaţii de molecule proteice. Imaginea electrono-microscopică a arătat că particulele intramembranare sunt încrustate în regiunea hidrofobă a membranei (fig. 7). Jumătatea externă a stratului lipidic bimolecular are suprafaţa E, care limitează celula de mediul extern şi o faţă P, care limitează compartimentul hidrofobic al stratului lipidic (fig. 8).

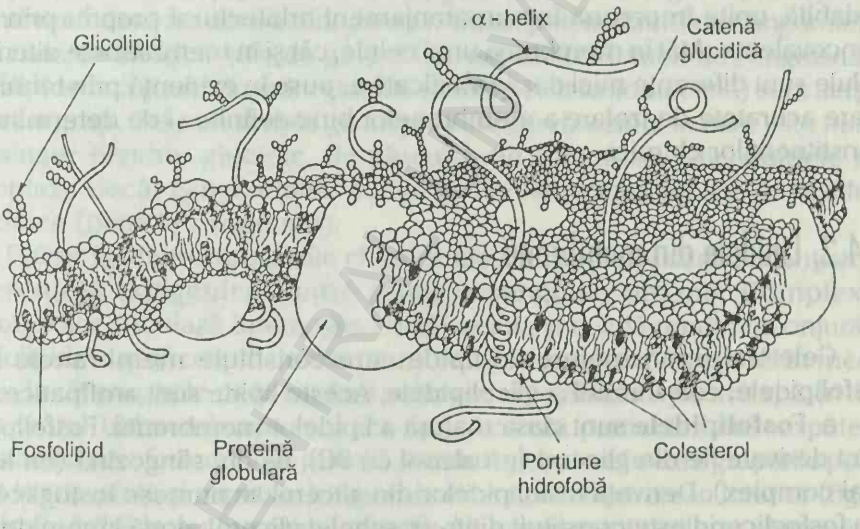


Fig. 7. Schema structurii membranei celulare.

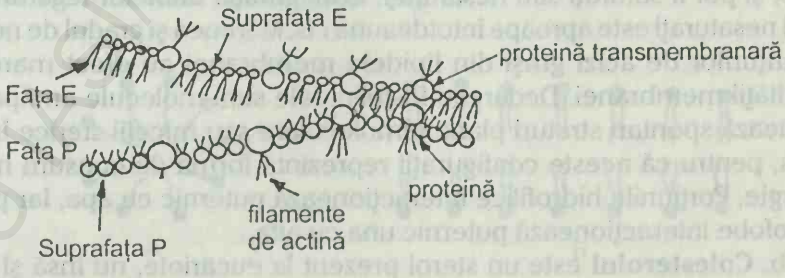


Fig. 8. Structura exterioară a membranei.

Faţa E şi faţa P a multor membrane conţine particule intramembranare dizolvate în compartimentul hidrofob al membranei, care sunt ancorate de citoplasmă prin elemente citoplasmatice fibrilare. Particulele intramembranare sunt mai numeroase pe faţa P. Descoperirea particulelor intramembranare cu ajutorul izotopilor radioactivi a dus la concluzia că membrana are o structură în mozaic, în care proteinele membranei par a fi "aisberguri", care plutesc şi se mişcă într-o mare de lipide (Singer şi Nicolson, 1972). Multe proteine de membrană care au o mare mobilitate în planul membranei sunt în majoritate glicoproteine. Reziduurile glucidice expuse pe suprafeţele E ale membranei sunt hidrofile şi interacţionează cu mediul înconjurător al membranei. Porţiunea hidrofobă a membranei separă domeniul fosfolipidic. Această porţiune poate avea molecule hidrofile dizolvate în lichidul citoplasmatic, sau centre de ancorare, de legare de filamente proteice citoplasmatice (actina) care ajută multe proteine plasmatice să plonjeze în afara membranei. Moleculele care au atât porţiuni hidrofile cât şi hidrofobe se numesc amfipatice. Membranele pot fi descrise drept complexe lipoproteice, care conţin lipide şi proteine în proporţie variabilă, unite împreună într-un aranjament arhitectural propriu prin forţe noncovalente. Atât în membrana unei celule, cât şi în membranele diferitelor celule sunt diferenţe mici dar semnificative, puse în evidenţă prin tehnici de mare acurateţe de izolare a membranelor bine definite şi de determinare a constituenţilor chimici.

2.4.2. Lipidele din membrană

Cele trei tipuri majore de lipide care constituie membranele sunt: fosfolipidele, colesterolul şi glicolipidele. Aceste lipide sunt amfipatice.

a. **Fosfolipidele** sunt clasa majoră a lipidelor membranei. Fosfolipidele sunt derivate fie din glicerol (un alcool cu 3C), fie din sfingozină (un alcool mai complex). Derivaţii fosfolipidelor din glicerol se numesc fosfogliceride. Un fosfoglicerid este constituit dintr-un schelet glicerol, două lanţuri de acizi graşi şi un alcool fosforilat. Acizii graşi cei mai obişnuiţi sunt cu 16 şi 18 atomi de C, şi pot fi saturaţi sau nesaturaţi. Configuraţia dublelor legături în acizii graşi nesaturaţi este aproape întotdeauna cis. Mărimea şi gradul de nesaturare al lanţurilor de acizi graşi din lipidele membranei au efect mare asupra fluidităţii membranei. Deoarece fosfolipidele sunt molecule amfipatice, ele formează spontan straturi plane bimoleculare sau micelii sferice în mediul apos, pentru că aceste configuraţii reprezintă forma de consum minim de energie. Porţiunile hidrofilice interacţionează puternic cu apa, iar porţiunile hidrofobe interacţionează puternic una cu alta.

b. **Colesterolul** este un sterol prezent la eucariote, nu însă şi la multe dintre procariote. Membrana plasmatică a celulelor eucariote este de obicei bogată în colesterol, în timp ce membranele organitelor conţin cantităţi mai

mici din această lipidă neutră. Colesterolul este o moleculă amfipatică şi se găseşte în membrană, intercalat între fosfolipide. Acest fapt face ca stabilitatea bistraturilor să crească şi să prevină pierderea lichidului din membrană la temperaturi scăzute. Concentraţia fosfolipidelor şi a colesterolului variază în membranele celulare ale organismelor care trăiesc la temperaturi extreme. Este posibil ca această variaţie să menţină fluiditatea membranei deasupra pragului compatibil cu viaţa. Dacă fluiditatea membranei ar scădea sub acest prag ipotetic, funcţiile vitale (cum ar fi transportul selectiv) ar înceta şi celula ar muri.

c. **Glicolipidele** sunt lipide legate covalent la un lanţ complex, care conţine diferite combinaţii de reziduuri glucidice. Glicolipidele constituie aproximativ 5% din toate lipidele membranelor şi sunt de asemenea molecule amfipatice. Compoziţia chimică variază considerabil la specii şi ţesuturi diferite. În celula animală, glicolipide ca sfingomielina sunt derivate din sfingozină, un aminoalcool care conţine un lanţ lung de hidrocarburi nesaturate. În sfingomielină grupările amino ale sfingozinei sunt legate de acidul gras printr-o legătură amidă, iar gruparea hidroxil a sfingozinei este esterificată formând fosforilcolina. Sfingomielina este singurul fosfolipid din membrană care nu derivă din glicerol. Glicolipidele diferă de sfingomielină prin natura unităţii legate de grupul hidroxil al scheletului de sfingozină. În glicolipide una sau mai multe glucide (altele decât fosforilcolina) sunt ataşate la acest grup. Cel mai simplu glicolipid este cerebrozidul în care este numai un singur reziduu glucidic, fie glucoza, fie galactoza. Glicolipidele mai complexe decât gangliozidele conţin multe lanţuri ramificate de reziduuri glucidice (până la 7 reziduuri).

Diferenţa dintre structurile chimice ale glicolipidelor sunt evidenţiate de diferenţele antigenice dintre grupele sanguine umane. Complexele glicolipidice mediază interacţiile celulă-celulă şi celulă-mediu înconjurător. Fosfolipidele şi glicolipidele din membrană se aranjează în aşa fel în mediul apos, încât grupările de la capătul polar vor avea afinitate pentru apă, în timp ce capătul hidrocarbonat va evita apa. Această particularitate va putea fi satisfăcută prin formarea de micelii, structuri globulare în care grupările polare sunt la suprafaţă şi capetele hidrocarburii sunt sechestrate în interior (fig. 8). Multe fosfolipide nu formează micelii. Alt aranjament preferat al grupărilor hidrofile şi hidrofobe ale acestor membrane lipidice este un strat bimolecular, numit de asemenea bistrat lipidic (fig. 9).

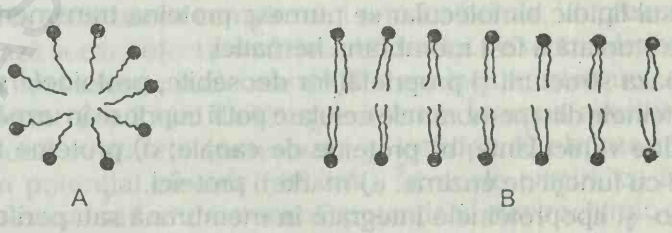


Fig. 9. Aşezarea complexelor lipoproteice sub formă de micelii (A) sau de straturi bimoleculare (B).

Structura pentru multe fosfolipide şi glicolipide în soluţii apoase este cea bistratificată mai degrabă decât cea în formă de miceliu, fapt care are o importanţă biologică mare, deoarece miceliul are o structură limitată (de obicei mai mică de 200 Å (în diametru) în timp ce structura bimoleculară poate avea dimensiuni macroscopice (10^7Å). Fosfolipidele şi glicolipidele sunt cheia constituenţilor de membrană, deoarece ele formează uşor straturi bimoleculare întinse, care sunt aproape fluide şi servesc ca bariere permeabile. În formarea straturilor bimoleculare este esenţial în special caracterul amfipatic al moleculelor de glico - şi fosfolipide. Pentru formarea bistratului lipidic (care este un produs de autoasamblare) interacţiunile hidrofobe constituie forţa majoră. Interacţiunile hidrofobe joacă un rol dominant şi în înglobarea proteinelor în soluţii apoase. La formarea stratului lipidic bistratificat mai intervin forţe de atracţie van der Waals între lanţurile de glucide, forţe de atracţie electrostatice şi legături de H între grupele polare şi moleculele de apă. Lipidele din stratul dublu sunt structuri noncovalente, cooperante. Fosfolipidele şi glicolipidele se adună împreună în apă, pentru a micşora numărul de lanţuri de glucide expuse. Factorii energetici (forţele de atracţie van der Waals, forţele de atracţie electrostatice şi legăturile de H) au trei consecinţe biologice semnificative: 1) straturile duble lipidice au tendinţa să fie extensive; 2) bistraturile lipidice au tendinţa să se plieze, aşa încât să nu fie capete de bicarbonaţi expuse, fapt ce duce la formarea compartimentelor; 3) bistraturile lipidice îşi rezolvă singure problemele energetice nefavorabile.

2.4.3. Proteinele din membrană, glicoproteinele și lipoproteinele

Lanţurile hidrofilice din glucidul proteinelor de membrană sunt proiectate în compartimentul extracelular apos. Aceste lanţuri complexe de glucide din structura glicoproteinelor contribuie la încărcătura negativă a suprafeţei celulare şi compun glicocalexul. Glicocalexul este un strat subţire de material în afara membranei plasmatice externe, care este implicat în recunoaşterea celulă-celulă şi este bine dezvoltat în special în celulele intestinului subţire, unde protejează membranele celulare de acţiunea distructivă a enzimelor digestive. Proteinele de membrană care se extind prin stratul lipidic bimolecular se numesc proteine transmembranare. Cea mai bine studiată a fost membrana hematiei.

Pe baza structurii şi proprietăţilor deosebite, proteinele simple, lipo- şi glicoproteinele din membranele celulare pot fi cuprinse în următoarele grupe: a) proteine vehiculante; b) proteine de canale; c) proteine receptoare; d) proteine cu funcţii de enzime: e) markeri proteici.

Glico- şi lipoproteinele integrate în membrană sau periferice îi asigură acesteia stabilitatea structurilor, dar şi plasticitatea. Spectrina şi anchirina din membrana hematiilor, cuplate cu sistemul elastic al tubulinei din

ergastoplasmă, asigură stabilitatea structurală şi plasticitatea membranei. Glucoforina, o altă glicoproteină integrată în membrana hematiilor, este alcătuită dintr-un singur lanţ peptidic de 131 aminoacizi. În porţiunea extracelulară a moleculei este cuplată câte o catenă laterală glucidică în 16 locuri deosebite, de aceea aproximativ 60% din masa acestei proteine este de natură glucidică. Porţiunea din interiorul membranei conţine circa 20 de aminoacizi şi este puternic apolară. Porţiunea C-terminală (orientată spre citoplasmă) este formată din aminoacizi bazici, puternic polari (arginina, lizina şi acizii aspartic şi glutamic).

Un rol structural deosebit revine proteinelor de membrană ale micro- şi macrofagelor. Corpusculii captaţi în celule prin endocitoză sub forma fagosomilor sunt înveliţi în porţiuni de membrană stabilite prin asamblarea unor proteine hexagonale deosebit de stabile, numite clatrine. Fibronectina şi adezina sunt alte glicoproteine importante, fixate pe suprafaţa externă a celulelor.

a) **Proteinele vehiculante**. Prin proprietăţile apolare şi capacitatea lor de a se combina reversibil cu unele substanţe (ioni, aminoacizi, glucoză etc.) proteinele vehiculante uşurează introducerea (pomparea) acestor substanţe în celulă sau eliminarea lor. Pe baza unui consum energetic, acest lucru poate fi realizat sub formă de transport activ şi împotriva gradientului de concentraţie.

Reprezentantul clasic al sistemului de transport activ transmembranar îl constituie pompa de sodiu-potasiu, alcătuită dintr-o glicoproteină tetrameră, compusă din două lanţuri α identice şi două lanţuri ß, după formula α_2, β_2. Peptidele α cu masa moleculară de 40 000 d sunt aşezate pe suprafaţa externă a membranei. Lanţurile ß sunt proteine integrate, care traversează membrana pe toată grosimea ei şi sunt enzime cu activitate ATP-azică. Partea lor exterioară poate lega glicozide steroidice (exemplu digitala sau digitoxina), iar cea interioară fixează molecule de ATP, împreună cu 3 ioni de Na^+ pe moleculă. Fixarea digitalei pe lanţurile ß inhibă manifestarea lor ATP-azică, deci şi randamentul schimburilor ionilor de Na^+ şi K^+. Ca urmare, conţinutul de Na^+ şi Ca^{++} al fibrelor miocardice creşte, fapt ce duce la creşterea capacităţii funcţionale a cordului.

Complexul enzimatic poate exista sub două forme cu conformaţie sterică diferită: E_1 şi E_2. Partea cu mare afinitate de fixare de ioni a formei E_1 este orientată spre interiorul celulei, în schimb forma E_2 se deplasează spre partea exterioară a membranei, fixând cu mare afinitate ionii de K^+. Prezenţa ionilor de Na^+ duce la stabilizarea complexului prin fosforilare, iar prezenţa ionilor de K^+ realizează acelaşi efect prin defosforilarea lui. Pe seama descompunerii enzimatice a unei singure molecule de ATP, are loc transportarea a 3 ioni de Na^+ spre exterior şi a 2 ioni de K^+ spre interior. În urma acestor deplasări între cele două suprafeţe (exterioară şi interioară) ale membranei se stabileşte un potenţial electric (-90 mV). În unele cazuri, ca în celulele epiteliului intestinal sau a tubilor renali, potenţialul electrochimic generat de ATP-aza Na^+/K^+ dependentă face posibil transportul simultan al unei alte substanţe neelectrolitice, cum este glucoza. Acest transport se poate manifesta

în sens identic (simport) sau în sens opus al transportului de ioni (antiport).

b) **Proteinele de canale.** Spre deosebire de proteinele de transport, care transformă temporar substanţele polare vehiculate în substanţe apolare, proteinele de canale produc temporar, chiar în membrane, canale mici hidrofile, prin care substanţele hidrofile pot pătrunde direct şi fără nici o modificare în interiorul celulelor. Din cauza diametrelor mari ale acestor canale, viteza de difuziune a unor ioni poate fi uimitor de mare. Printr-un canal deschis în sarcolema fibrelor musculare striate pot trece în fiecare secundă 300 ioni de Ca^{++}.

Majoritatea canalelor sunt închise în stare de repaus şi se deschid fie în urma unui curent de acţiune, fie prin fixarea unor mediatori pe receptorii corespunzători. Pot fi deosebite astfel canale care sunt puse în funcţiune prin potenţial electric (Voltage Operated Channels = VOC) şi canale puse în funcţiune prin receptori (Receptor Operated Channels = ROC).

Reprezentanţii cei mai bine cunoscuţi ai canalelor puse în funcţiune prin potenţial electric îl constituie canalele rapide de Na^+ şi cele lente de Ca^{++} din sarcolema fibrelor musculare. Potenţialul este creat de pătrunderea rapidă a Na^+ în celulă, paralel cu ieşirea corespunzătoare a K^+, iar contracţia musculară este declanşată de creşterea cantităţii calciului ionizat în sarcolemă. În cursul acestor modificări, o lipoproteină amfipatică numită calciductina este fosforilată de către o proteinkinază dependentă de cAMP şi astfel lipoproteina poate fixa şi transporta ionii de Ca^{++} de la suprafaţa externă a membranei pe cea internă. Este de remarcat faptul că antibioticul gramicidină-A, cu structura sa tubulară, pătrunde în membranele celulare, prin care face posibilă pătrunderea într-o proporţie de 1:3 a ionilor de Na^+ şi K^+. Permeabilitatea faţă de ioni a canalelor rapide şi lente este reglată de două tipuri de supape: unul activator şi celălalt inhibitor. Aceste supape sunt alcătuite din moleculele unor lipoproteine amfipatice, care în funcţie de încărcătura bioelectrică a membranei, se pot deplasa în interiorul membranei. În cazul unei depolarizări, fac posibilă pătrunderea în interiorul celulei a anionilor încărcaţi electronegativ. În acelaşi timp, cationii (cu încărcătură electropozitivă) se deplasează în sens opus şi astfel blochează pătrunderea altor ioni. Ionii de Ca^{++} pot pătrunde în celule numai în cazul în care ambele supape ale canalelor lente sunt deschise.

Deschiderea canalelor care funcţionează prin receptori se declanşează prin fixarea unui mediator de către structura receptoare corespunzătoare a membranei. În cazul acesta, în funcţie de natura şi proprietăţile mediatorilor, se deschid canale separate pentru ionii de Ca^{++}, K^+ şi Na^+.

Membranele hematiilor conţin canale pentru anioni (Cl^-, HCO_3^-), care asigură pătrunderea rapidă a acestora din plasmă în celule. Acest canal anionic este alcătuit dintr-o proteină dimeră, care conţine două lanţuri polipeptidice, ce reprezintă circa un sfert din conţinutul proteic total al membranei. Catena laterală glucidică este polară şi se situează pe suprafaţa externă a membranei eritrocitare. Partea apolară este localizată în interiorul membranei şi continuă şi spre interiorul hematiei. Transportul anionilor are loc în ambele sensuri, de-a lungul acestei structuri.

Canalele pot fi formate în membrane şi în condiţii patologice. Efectul citolitic al activării nespecifice a properdinei, respectiv specifice a sistemului de complement, se manifestă prin activarea factorilor C_7, C_8 şi C_9. Aceşti factori se asamblează în grosimea membranelor sub formă de canale cu un diametru mare, care permit pătrunderea bruscă şi explozivă a ionilor de Ca^{++} în celulă. Ionii de Ca^{++} în exces duc la contracţia elementelor citoplasmatice elastice (tubulina), din care cauză celulele îşi pierd plasticitatea şi se fărâmiţează chiar şi în urma unor acţiuni mecanice slabe. Limfocitele T_8 (CD_8) şi limfocitele citotoxice (Killer) secretă o proteină similară, numită perforina, care, intrând în contact direct cu celula ţintă, formează în membrana acesteia canale similare, cu consecinţe identice cu cele amintite mai sus. Unele antibiotice (numite de transport) ca gramicidina-A şi valinomicina, distrug microbii prin formarea canalelor în membranele acestora. În urma pătrunderii ionilor se produce o hiperosmoză, urmată de difuziunea sporită a apei, care provoacă ruperea membranei microbiene din cauza creşterii însemnate a volumului (swelling).

Orificiile membranei. Legătura între celule învecinate poate fi realizată şi prin pori relativ mari şi multipli. Prin aceste orificii pot pătrunde în celulă sau pot fi schimbate între ele atât lipide apolare, cât şi substanţe polare ca apă, săruri, metaboliţi, proteine etc. Asemenea legături prin pori există mai ales între hepatocite. Din punct de vedere structural şi funcţional, aceste orificii sunt alcătuite din proteine speciale, mobile, care se pot deplasa în membrană în aşa fel încât ele funcţionează ca nişte supape reglatoare pentru difuziunea apei şi a substanţelor dizolvate. Mişcarea de deschidere sau închidere a proteinelor reglatoare este dirijată de cantitatea ionilor de Ca^{++} din citoplasma celulelor. Din cauza acestor legături prin orificii intercelulare, un ansamblu multicelular ca lobul hepatic poate funcţiona ca un tot unitar. Schema structurii legăturilor prin deschideri intercelulare este prezentată în figura 10.

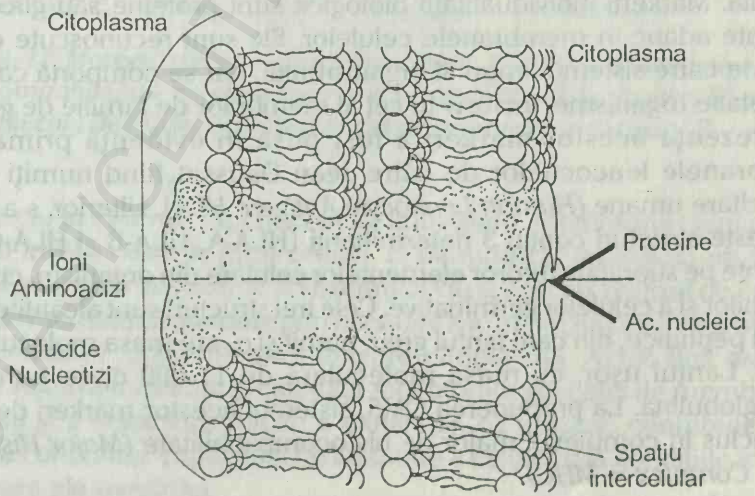


Fig. 10. Legături intercelulare prin orificii de membrană.

c) **Proteinele receptoare.** Comunicările mutiple intercelulare în organism se realizează cibernetic, adică prin emiterea unor semnale codificate la nivelul centrului reglator, recepţionate şi apoi decodificate de structurile receptoare de membrană a celulelor ţintă şi transmise spre sistemele integrate. În porţiunea lor externă, hidrofilă, numită şi unitate fixatoare predomină acidul neuraminic (sialic) ca element puternic polarizat. Această porţiune poate fixa cu afinitate mare, dar cu specificitate relativ redusă, o serie de mediatori cu caracter bazic (aminic) printre care şi mediatorul specific.

În apropierea receptorului sunt localizate glicolipide (sfingomielinele) care prezintă o afinitate mult mai redusă, dar o specificitate absolută faţă de mediatorul respectiv. Legând mediatorul din ansamblul aminelor fixate de receptor, sfingomielinele amfipatice alunecă spre unitatea catalitică a receptorului situată în porţiunea interioară a membranei. La acest nivel se realizează decodificarea mesajului şi transmiterea lui la enzima ţintă intracelulară.

Pe lângă structurile receptoare de mediatori, membranele unor celule (macrofage, fibroblaşti) pot conţine şi receptori pentru captarea unor macromolecule ca transferina, ß-lipoproteinele, fragmentul Fc al imunoglobulinelor etc.

d) **Enzimele din membrană.** Conţinutul bogat în enzime cuprinde protein-enzime atât integrate, cât şi periferice. Din grupa enzimelor integrate fac parte gama-glutamil-transferaza (γ -GTP) şi adenilat ciclaza. Alte enzime se localizează în membrană periferic: lipoprotein-lipaza pe suprafaţa celulelor endoteliale, unele enzime care transferă resturi de glucide ca galactozil-transferaza, fucozil-transferaza, neuraminil-transferaza etc.

e) **Proteine semnalizatoare.** Deşi din punct de vedere funcţional, fiecare oganism superior este alcătuit din ansamblul unor celule deosebite, aceste celule sunt totuşi purtătoarele determinanţilor (markerilor) individuali ai acestuia. Markerii individualităţii biologice sunt proteine sau glicoproteine ancorate adânc în membranele celulelor. Ele sunt recunoscute ca proprii (self) de către sistemul imun al organismului, dar se comportă ca antigene în celelalte organisme, inclusiv în cel al membrilor de familie de gradul I.

Prezenţa acestor markeri a fost pusă în evidenţă prima dată în membranele leucocitelor de către Jean Dausset, fiind numiţi antigene leucocitare umane *(Human Leukocyte Antigen: HLA)*. Ulterior, s-a constatat că aceste structuri conţin 3 determinanţi (HLA-A, HLA-B şi HLA-C) şi sunt prezente pe suprafaţa tuturor elementelor celulare din organism, cu excepţia hematiilor şi a celulelor germinative. Cele trei structuri sunt alcătuite din două lanţuri peptidice, din care lanţul greu, numit şi α, are masa moleculară de 40 000 d. Lanţul uşor, cu masa moleculară de 11 000 d, se numeşte ß2-microglobulina. La propunerea OMS, sistemul acestor markeri de clasa I a fost inclus în complexul major de histocompatibilitate *(Major Histocompatibility Complex = MHC)*.

Pe plan experimental, George Suell a găsit markeri similari şi în membranele celulelor epiteliale la rozătoare, iar Baruj Benaceraf a

demonstrat că imunocitele (macrofagele, limfocitele T şi B) pe lângă markerii de clasa I, dispun şi de markeri deosebiţi (HLA-DP, DQ şi DR) numiţi markeri de histocompatibilitate de clasa a II-a. Aceste structuri sunt alcătuite tot din două lanţuri peptidice. Lanţul greu, numit lanţul α are masa moleculară de 40 000 d, iar cel uşor sau lanţul ß are masa moleculară de 30 000 d. Pe baza numărului mare (peste 60) al variaţiilor antigenice ale fiecărui marker şi a codominanţei alelelor genelor, numărul variaţiilor individuale posibile este de ordinul zecilor de miliarde. Pentru meritele lor deosebite realizate în descoperirea şi caracterizarea acestor structuri, cei 3 cercetători amintiţi au fost laureaţi cu premiul Nobel pentru medicină în anul 1980.

În afara markerilor prezentaţi mai sus, limfocitele T şi B dispun şi ele de markeri proprii, numiţi receptorul celular T, respectiv B şi sunt molecule de imunoglobuline în membranele limfocitelor (fig. 11).

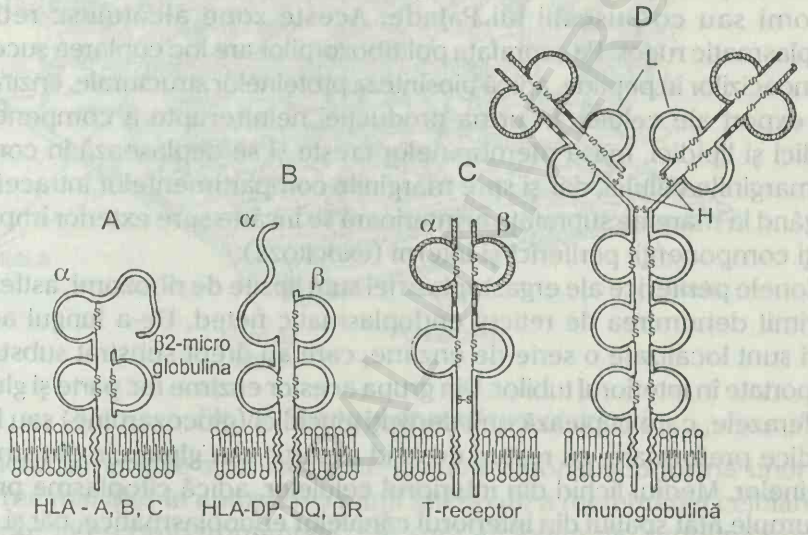


Fig. 11. Markerii din membranele celulare: A) şi B) = antigenele de histocompatibilitate de clasa I şi a II-a; C) receptorul T-limfocitar; D) = molecula de imunoglobulină fixată pe suprafaţa limfocitelor B.

Reiese că, în contrast cu concepţiile anterioare, membrana celulară nu este numai înveliş pasiv în jurul celulei, ci dimpotrivă, reprezintă un factor deosebit de complex şi dinamic al sistemului viu şi deschis realizat de celule. Porţiunile de membrană pierdute prin năpârlire sau endocitoză sunt substituite prin flux continuu al membranei dinspre citoplasmă. Acest flux asigură stabilitatea relativă a calităţii şi cantităţii receptorilor specifici de membrană, a numărului şi a stării funcţionale a canalelor, ca urmare, contribuie şi la menţinerea continuă a capacităţii de adaptare a celulelor la condiţiile mereu schimbătoare ale mediului.

Sursele cele mai importante de informaţie pentru studiul structurii şi funcţiei membranei au fost membranele artificiale.

2.5. Citoplasma

a) **Sistemul tubular citoplasmatic**. Spre deosebire de imaginile microscopice obişnuite, care au descris citoplasma sub forma unei mase structurale numită hialoplasmă, studiile electronooptice au arătat că întreaga masă de citoplasmă este alcătuită dintr-un sistem canalicular fin şi multianastomozat. Această reţea tubulară este numită reticul endoplasmatic sau ergastoplasmă. Peretele tuburilor este alcătuit dintr-o membrană cu un strat dublu lipidic, care delimitează lumenul tuburilor de spaţiul extratubular citoplasmatic. În zonele din jurul nucleului celular, tuburile sunt înconjurate de mici corpusculi sferici (cu diametrul între 10-30 nm, 100-300 Å) numiţi ribozomi sau corpusculii lui Palade. Aceste zone alcătuiesc reticulul endoplasmatic rugos. Pe suprafaţa poliribozomilor are loc cuplarea succesivă a aminoacizilor în peptide, adică biosinteza proteinelor structurale, enzimatice şi de export ale celulei. În urma producţiei neîntrerupte a componenţilor protidici şi lipidici, masa membranelor creşte şi se deplasează în continuu spre marginile celulei, dar şi spre marginile compartimentelor intracelulare. Ajungând la margine suprafaţa ei interioară se învârte spre exterior împreună cu toţi componenţii periferici şi interni (exocitoza).

Zonele periferice ale ergastoplasmei sunt lipsite de ribozomi, astfel încât au primit denumirea de reticul endoplasmatic neted. De-a lungul acestor tuburi sunt localizate o serie de enzime, care au drept substrat substanţele transportate în interiorul tubilor. Din grupa acestor enzime fac parte şi glucoziltransferazele, care cuplează unii derivaţi glucidici (glucozamine) sau lanţuri glucidice preformate, cu resturi de acid aspartic sau glutamic din structura proteinelor. Mediul lichid din interiorul celulelor, adică citoplasma propriu-zisă, umple atât spaţiul din interiorul canalelor endoplasmatice, cât şi pe cel din afara lor. Acest mediu lichid este alcătuit dintr-un amestec complex al ionilor hidrosolubili ai unor substanţe organice micro- şi macromoleculare, dizolvate în apă. Circulaţia intracelulară a acestui lichid citoplasmatic se manifestă pe de o parte prin mişcările active ale elementelor contractile celulare şi pe de altă parte prin forţe hidrodinamice, produse de diferenţe mici de osmolaritate între mediu şi celulă, respectiv între diferitele microcompartimente intracelulare.

b) **Sisteme de susţinere ale celulei**. Alături de tuburile ergastoplasmei, cercetările electronomicroscopice au pus în evidenţă în citoplasmă atât prezenţa unor fibre fine, numite microfilamente, cât şi a unor microtuburi. Aceste structuri pornind de la suprafaţa internă a membranei celulare, sub forma fibrelor de *stress*, formează în citoplasmă o reţea elastică şi solidă multiramificată. În punctele de încrucişare ale coloanelor se acumulează ribozomi, formând unităţi funcţionale separate, numite citoplaşti. Prin funcţiile multiple ale citoplaştilor se realizează toate transformările, transporturile, inclusiv exporturile de substanţe, dar şi toate formele de

motilitate celulară ca mişcările active, endocitoza, exocitoza, diviziunea celulară, schimbările pasive ale formei etc. Este de remarcat faptul că structura citoplasmatică a celulelor transformate malign este mult mai dezordonată şi grosolană. Figura 12 prezintă schematic sistemul celular de susţinere.

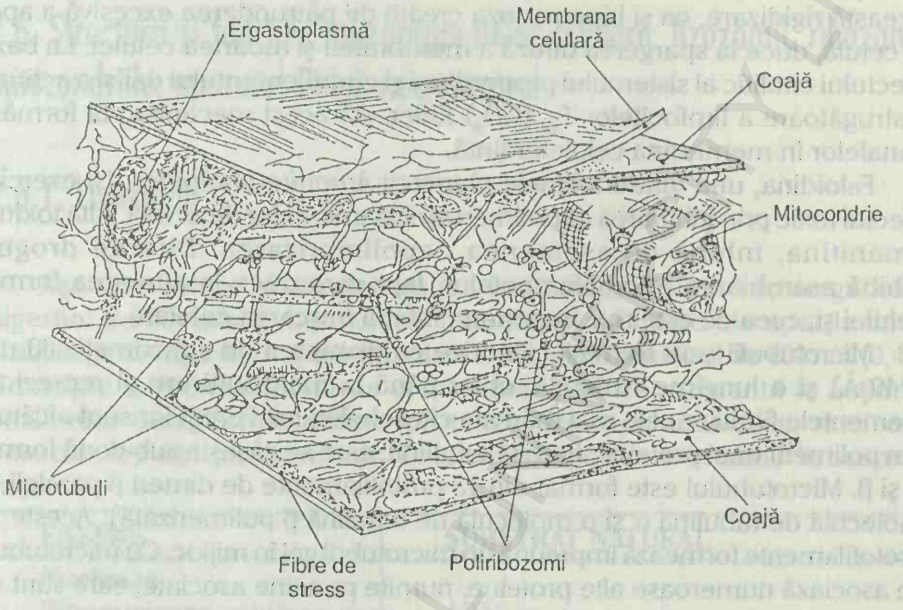


Fig. 12. Sistemul de susţinere al celulei.

Microfilamentele sunt localizate în mod ordonat sub forma unor fibre fusiforme mai ales în apropierea părţii interioare a membranei celulare, dar şi a celor intercompartimentale. Ele sunt alcătuite din proteine contractile ca: miozina, actina, tropomiozina şi α -actina. În multe celule eucariote, actina este cea mai abundentă proteină intracelulară, de aceea microfilamentele se mai numesc şi filamente de actină. Actina poate avea forme şi funcţii diferite. În stare nepolimerizată actina este o proteină globulară cu greutatea moleculară de 43 000 d şi se numeşte actina-G. Deşi globulară, actina G se poate polimeriza şi formează filamente (actina F). Microfilamentele se asociază cu mai mult de 50 de proteine, care le permit să îndeplinească funcţiile. Cea mai obişnuită dintre aceste proteine este miozina, care se găseşte atât în celulele musculare, cât şi în cele nemusculare. Structura microfilamentelor este asemănătoare fibrelor musculare netede. În zonele centrale ale citoplasmei sunt situate în mod dezordonat ceea ce indică faptul că se consumă rapid, dar şi că se construiesc la fel de repede. Interacţiunea actinei, miozinei şi adenozintrifosfatului (ATP) generează forţa de contracţie a muşchiului. Polimerizarea şi depolimerizarea sunt reglate prin controlul proteinelor care leagă actina. Capacitatea de contracţie a microfilamentelor este condiţionată de cantitatea citoplasmatică

a ionilor de Ca^{++}. Creşterea cantităţii acestora declanşează contracţia, scăderea lor duce la relaxarea filamentelor. Ionii de Ca^{++} necesari pentru contracţie provin din granulele de acumulare de calciu, ca şi din mitocondrii. Ionii de Ca^{++} sunt fixaţi întâi pe calmodulină. Orice acţiune care duce la creşterea excesivă a calciului citoplasmatic (deschiderea prea multor canale în membrană) provoacă contracţia microfilamentelor şi astfel rigidizarea lor. Această rigidizare, ca şi hipoosmoza creată de pătrunderea excesivă a apei în celulă, duce la spargerea difuză a membranei şi moartea celulei. La baza efectului citolitic al sistemului properdinei şi complementului dar şi a acţiunii distrugătoare a limfocitelor T_{8k} (CD_8) Killer, stă acest mecanism al formării canalelor în membrana celulelor ţintă.

Faloidina, una dintre toxinele ciupercii *Amanita phaloides*, îşi exercită efectul toxic prin inhibarea depolimerizării filamentelor de actină. Altă toxină, amanitina, inhibă de asemenea depolimerizarea. Diferite droguri inhibă asamblarea microfilamentelor, fapt care duce la alterarea formei celulei şi, ceea ce este mai important, inhibă mişcarea celulară.

Microtubulii sunt formaţii cilindrice cu diametrul de aproximativ 30 nm (240 Å) şi o lungime variabilă, chiar până la mai mulţi μm şi reprezintă elementele fibrilare cele mai mari ale citoscheletului. Pereţii lor sunt alcătuiţi din polimerii unei proteine, numită tubulină, care se găseşte sub două forme: α şi β. Microtubulul este format din 13 protofilamente de dimeri β paraleli (o moleculă de tubulină α şi o moleculă de tubulină β polimerizată). Aceste 13 protofilamente formează împreună un microtubul gol în mijloc. Cu microtubulii se asociază numeroase alte proteine, numite proteine asociate, care sunt un component al reglării asamblării şi dezasamblării lor.

Microtubulii sunt implicaţi în mişcările intracelulare şi extracelulare. În asociere cu alte proteine, în special dineina, generează forţa de contracţie care duce la mişcarea cililor şi flagelilor. Sub acţiunea cAMP se activează enzima protein-kinază, care fosforilează moleculele de tubulină şi provoacă agregarea, deci contractarea acestora. Defosforilarea tubulinei duce în schimb la dezagregarea, deci relaxarea tubilor. Dat fiind că microtubulii se pot deplasa liberi între ei, contracţiile, respectiv relaxările lor, asigură stabilitatea structurală, dar şi plasticitatea celulelor. Microtubulii formează canale prin care se mişcă veziculele intracelulare şi organelele. Aceste mişcări solicită energia obţinută prin hidroliza de ATP şi este dirijată de proteine speciale. Kinezina mişcă veziculele de la polul (–) către polul (+) al microtubulilor. O altă proteină specifică asociată cu microtubul mişcă veziculele în direcţie opusă faţă de kinezină.

Microtubulii au o funcţie importantă în mitoză, deoarece ei formează fusul mitotic care este responsabil de separarea cromozomilor.

Efectele medicamentelor antimitotice asupra microtubulilor

Multe medicamente antineoplazice blochează polimerizarea (asamblarea) sau depolimerizarea (dezasamblarea) microtubulilor. Dintre medicamentele care inhibă asamblarea mai folosite sunt: vinblastina,

vincristina, colchicina. Colchicina blochează polimerizarea microtubulilor şi, probabil, acţionează prin inhibarea fagocitozei cristalelor de acid uric de către leucocite. Fagocitoza duce la liza acestor celule, fapt ce măreşte răspunsul inflamator. Taxolul este un medicament care inhibă depolimerizarea microtubilor.

2.6. Structura și funcțiile microorganitelor celulare: lizozomii, ribozomii, mitocondriile, aparatul Golgi, microcentrul

2.6.1. Lizozomii

Aşa cum reiese şi din denumirea lor, lizozomii sunt microorganelele digestiei intracelulare. Cu ajutorul microscopului clasic ele apar la limita vizibilităţii, ca nişte formaţiuni granulare sferice, cu diametrul de 400 nm (0,4μ). Granulele sunt înconjurate de o membrană foarte rezistentă la acţiunile enzimelor deosebit de active (proteaze, lipaze, glucozidaze, nucleaze, peroxidaze) din interiorul lor. Cele mai importante enzime lizozomale sunt:

ENZIME	SUBSTRAT NATURAL
Nucleaze	
Ribonucleaza acidă	ARN
Desoxiribonucleaza	ADN
Proteaze	
Catepsina	Proteine
Colagenaza	Colagen
Peptidaza	Peptide
Fosfataze	
Fosfataza acidă	Fosfomonoesteri
Fosfodiesteraza acidă	Oligonucleotide şi alţi fosfodiesteri
Enzime care hidrolizează polizaharide şi mucopolizaharide	
β -galactozidaza	Galactozide
α - glucozidaza	Glicogen
α - monoxidaza	Manoze şi glicoproteine
ß-hexominidaza	Glicolipide
Glicocerebrozidaza	Glicolipide
β -glucuronidaza	Polizaharide şi mucopolizaharide
Lizozimul	Pereţii celulei bacteriene şi mucopolizaharidele
Hialuronidaza	Acidul hialuronic, condroitinsulfatul
Aril sulfataza	Sulfaţii organici

Enzime care degradează lipidele

Esterazele	Acizii esterilor graşi
Fosfodiesterazele	Fosfolipidele

Macromoleculele sunt incluse în celule prin pinocitoză, corpusculii mai mari (virusuri, microbi, granule) sunt înglobaţi prin endocitoză. În cursul înglobării, particula fixată pe membrană este înconjurată de membrana celulară, întărită de o proteină specială deosebit de rezistentă, cu structură hexagonală, numită clatrină. Fagozomul astfel format este deplasat spre interiorul celulei, unde se anastomozează prin contopire cu unul sau mai mulţi lizozomi, transformându-se în fago-lizozomi. În interiorul acestora are loc descompunerea enzimatică a alimentelor ingerate. Rezistenţa mare a membranei lizozomiale asigură izolarea perfectă a enzimelor digestive active de restul celulei. În cazul în care aceste enzime pătrund totuşi în citoplasmă (de exemplu în urma creşterii acidităţii sub pH=5) are loc autodistrugerea celulei. Din acest motiv, Cristian de Duve, 1968, a numit lizozomii "săculeţe de sinucidere" ale celulei. În organism celulele specializate pentru endocitoză sunt macrofagele (monocitele) şi granulocitele polimorfonucleare (microfagele). Aceste elemente îşi pot goli şi spre exterior (substanţa fundamentală a organelor şi ţesuturilor) conţinutul enzimatic al lizozomilor prin degranulare. Funcţia esenţială a lizozomilor este aceea de a controla digestia intracelulară a macromoleculelor. Toate hidrolazele acide conţinute în lizozomi sunt menţinute la pH=5,0 şi sunt inactive în citozol unde pH-ul este neutru. Acest fapt asigură celula în cazul ruperii accidentale a membranei lizozomale (fig. 13).

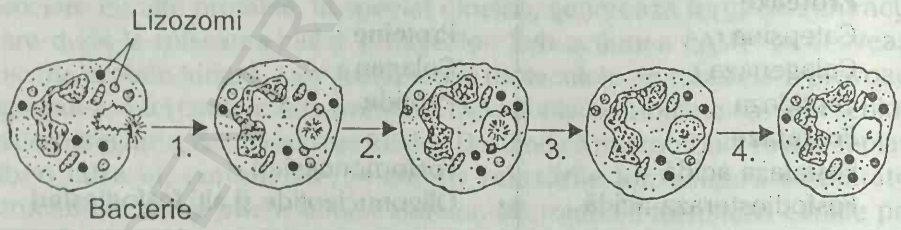


Fig. 13. Endocitoza, formarea fagozomului şi a fagolizozomului. 1. Endocitoză, 2. Degranulare, 3. Distrugere, 4. Digerare

În urma tulburărilor funcţionale sau a lipsei congenitale a unor enzime lizozomale poate să apară scăderea sau chiar lipsa totală a descompunerii lizozomiale a unor substanţe înglobate sau produse în lizozomi. Din această cauză are loc acumularea patologică în celulele respective a substanţelor nedescompuse, ducând la manifestarea diferitelor forme de tezaurismoze. Iniţial, aceste boli au fost denumite după numele celui care le-a descris primul: Boala von Gierke, boala Gaucher etc.

Boala Tay-Sachs este o deficienţă a enzimei ß-N-acetilhexozaminidaza. Concentraţia de gangliozide din celulele creierului este mare. Produşii de

scindare dau dereglări neurologice severe şi moarte timpurie a copiilor născuţi cu această boală autozomal recesivă.

În urma identificării enzimei deficitare, diferitele tezaurismoze sunt denumite după enzima respectivă, de exemplu: lipsa glucozo-6-fosfatdehidrogenazei, lipsa cerebrozidazei etc. Mucolipidoza II rezultă datorită deficitului unui mare număr de enzime lizozomale. Lizozomii acestor bolnavi conţin o mare cantitate de glucolipide nedegradate şi glucozaminoglicani, deoarece aceştia nu pot fi hidrolizaţi. Rezultatul este o degradare severă neurologică şi deformări osoase.

Peroxizomii au o structură asemănătoare cu cea a lizozomilor. Ei conţin enzime care degradează aminoacizii şi acizii graşi. Prin aceste reacţii se produce peroxidul de hidrogen (H_2O_2). Deoarece peroxidul de hidrogen este dăunător celulei, peroxizomii conţin o cantitate mare de catalaze, enzime care convertesc peroxidul de hidrogen în apă şi oxigen.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2H_2O+O_2$$

2.6.2. Ribozomii

Ribozomii organismelor eucariote, deşi au funcţii similare cu cei de la procariote, au o structură mai complexă decât aceştia. Ribozomii eucariotelor sunt în citozol fie singuri (monozomi) fie ca ribozomi multipli ataşaţi de un ARN mesager (poliribozomi sau polizomi). Ribozomii se mai numesc şi corpusculii lui Palade şi sunt microorganele submicroscopice (cu diametrul de 15-20 nm) ale biosintezei proteinelor, adică ale traducerii codului genetic nuclear, transportat de acidul ribonucleic mesager (mARN). Poliribozomii sunt repartizaţi de-a lungul canalelor ergastoplasmei rugoase. Din punct de vedere structural, ei sunt alcătuiţi din două subunităţi, dintre care cea mai mică are viteza de sedimentare de 30 S, iar cea mai mare de 50 S. Acizii ribonucleici proprii (ARNr), tot de origine nucleară, ale acestor subunităţi, joacă un rol substanţial în reglarea funcţiilor ribozomilor.

Aminoacizii folosiţi pentru biosinteza proteinelor sunt activaţi de către kinaze specifice, cu consum de ATP. Aminoacizii activaţi se fixează pe un acid ribonucleic de transfer (ARNt) specific, produs tot în nucleu, care dispune de anticodonul aminoacidului.

Aminoacizii activaţi şi legaţi de ARNt sunt transportaţi la poliribozomi, fixându-se pe suprafaţa A (A=aminoacid) a acestora (fig. 14).

Poliribozomii fixează ARNm pe suprafaţa unităţii mici. Sinteza proteinelor, adică cuplarea aminoacizilor activaţi, începe cu citirea codonului START (AUG şi GUG) prin fixarea anticodonului pentru formil-metionină al ARNt. Aceasta este urmată de fixarea anticodonului ARNt care transportă primul aminoacid din secvenţa codificată, transportată de o proteină numită factor de elongare, la suprafaţa A a ribozomilor. Legăturile peptidice se

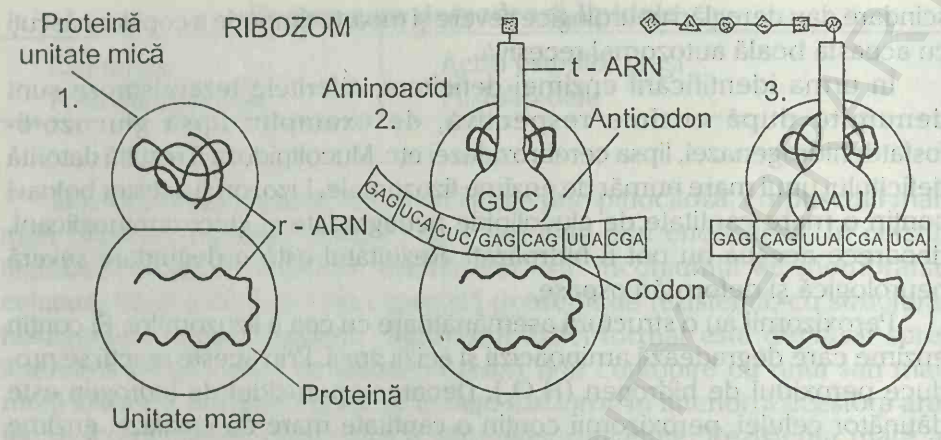


Fig. 14. Schema structurii ribozomilor (1), *mecanismul biosintezei proteinelor* (2) *fixarea tARN*, (3) *cuplarea aminoacizilor.*

realizează pe seama descompunerii de GPT, după care ARNt se eliberează. Lanţul peptidic crescând în lungime, se transpune prin translocaţie pe suprafaţa P (P=proteina) a poliribozomilor. În acelaşi timp şi ARNm se deplasează cu câte un codon pe suprafaţa subunităţii mari. O dată cu traducerea informaţiei comunicate de ARNm se încheie biosinteza lanţului peptidic. Semnalul STOP (UAG, UAA, UGA) este citit de proteine specifice, numite factori de eliberare (*releąsing factor*) care realizează şi desprinderea proteinei nou-formate de pe suprafaţa ribozomilor. În acelaşi timp se disociază şi componenţii mici şi mari ai ribozomilor, aceştia reunindu-se numai în momentul sosirii unui nou mesaj adus de un nou ARNm.

2.6.3. Mitocondriile

Mitocondriile sunt microorgane celulare, cu diametrul între 500-2000 nm (0,5-2,0 μ) dispersate în citoplasmă şi cuprinse în reţeaua complexă a microfilamentelor şi microtubulilor. Cu ajutorul microscopului se găsesc şi ele foarte aproape de limitele vizibilităţii, fără posibilitatea vizualizării amănuntelor structurale. Cu ajutorul examinărilor electronooptice a fost pusă în evidenţă structura lor fină, lamelară, delimitată spre citoplasmă prin două membrane lipidice bistratificate. Suprafaţa membranei exterioare este fin granulată spre citoplasmă. În interiorul granulelor sunt localizate enzimele ciclului acizilor tricarboxilici. Membrana interioară trimite prelungiri (criste) spre interiorul matricei mitocondriale. Cristele împart matricea în mai multe compartimente, iar între membranele externă şi internă există spaţiul intermembranal (fig. 15).

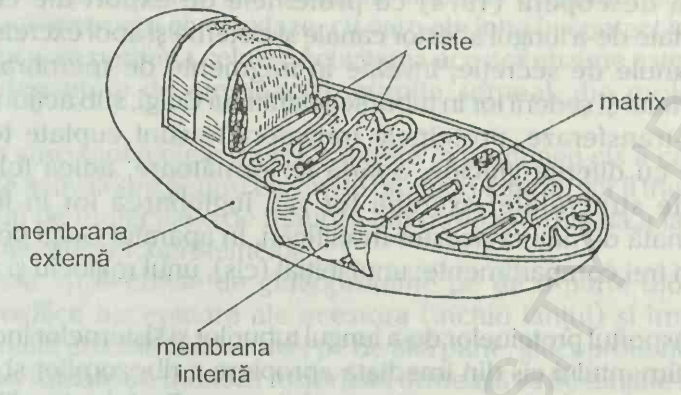


Fig. 15. Schema structurală a mitocondriei.

Matricea din interiorul mitocondriilor este o substanţă granulară fibrilară, care conţine multe feluri de enzime, printre care şi enzimele ß-oxidării acizilor graşi. Pe suprafaţa cristelor, care pătrund în matrice, se găsesc granule mici, numite particule elementare sau oxizomi, legate de membrana bazală printr-un ligament mic membranos. Într-o mitocondrie se găsesc 15 000-20 000 oxizomi, care conţin enzimele lanţului respirator (citocromii şi enzima roşie a lui Warburg). Eliberarea şi depozitarea energiei substanţelor nutritive sub formă de ATP are loc în interiorul oxizomilor. Aici se găseşte ATP-aza mitocondrială, care catalizează reacţia în ambele sensuri, adică atât prin formarea, cât şi prin descompunerea ATP.

Mitocondriile reprezintă termocentralele celulelor. Aceasta reiese şi din faptul că ele se adună în jurul zonelor intracelulare, cu un necesar energetic însemnat. În mod similar, pe plan histopatologic, scăderea numărului sau alterarea structurii mitocondriilor este un semn al leziunilor celulare.

2.6.4. Aparatul Golgi

Această formaţiune tubulo-acinoasă a fost identificată în citoplasma celulelor glandulare de Camillo Golgi cu ajutorul impregnării cu săruri de argint. Ulterior s-a constatat că ea reprezintă o formă deosebită a reticulului endoplasmatic neted şi este prezentă în toate felurile de celule din organism. Din punct de vedere structural, aparatul lui Golgi derivă din canalele netede ale ergastoplasmei, care se acumulează spre periferia celulei, sub forma unui număr de 5-6 cisterne. Deoarece membranele din complexul

Golgi au formă de discuri turtite, mai sunt denumite şi dictiozomi. George E. Palade a descoperit (1974) că proteinele de export ale celulelor sunt transportate de-a lungul acestor canale şi cisterne şi apoi excretate sub forma unor granule de secreţie, învelite în fragmente de membrană. În cursul transportului şi şederii lor în tuburile aparatului Golgi, sub acţiunea enzimelor glucozil-transferaze, proteinele transportate sunt cuplate temporar sau definitiv cu diferite glucide. Soarta lor următoare, adică folosirea lor ca elemente structurale, excreţia lor sau înglobarea lor în lizozomi este determinată de natura acestor modificări. În aparatul Golgi pot fi deosebite cel puţin trei compartimente: unul iniţial (cis), unul mijlociu şi unul terminal (trans).

Transportul proteinelor de-a lungul tuburilor şi sistemelor începe la nivelul compartimentului cis din imediata apropiere a ribozomilor şi se termină la capătul terminal al compartimentului trans. Proteinele eliberate de pe suprafaţa ribozomilor conţin o secvenţă terminală de aminoacizi, numită secvenţa semnal, care se potriveşte cu capătul corespunzător al unei proteine, numită proteina de recunoaştere a semnalului, cuprinsă în pereţii canalelor. Proteina de recunoaştere a semnalului transmite peptidul fixat temporar unei alte proteine structurale, numită proteina de "docare" (*Docking Protein, DP*). De la acest nivel proteinele sintetizate pe ribozomi sunt introduse în canalele aparatului Golgi şi sunt transportate spre periferia celulei (fig. 16).

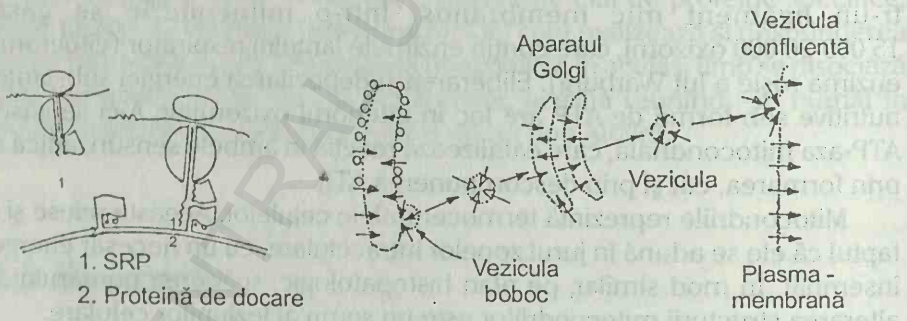


Fig. 16. Transportul proteinelor în canalele ergastoplasmei.

În porţiunea incipientă a canalelor, o enzimă, glucozoaminotransferaza fixează câte o moleculă de glucozamină (liberă sau N-acetilată) pe un rest de acid glutamic al proteinelor. Apariţia acestei hexozamine în proteină reprezintă semnalul intrării în funcţie a manozo-transferazelor, care cuplează unul sau mai multe resturi de manoză cu glucozamina deja legată.

Aceasta înseamnă că în porţiunea iniţială (cis) a canalelor aparatului Golgi se găsesc proteine cu o compoziţie de aminoacizi diferită, dar cu

catene laterale glucidice identice sau cel puţin foarte asemănătoare.

Soarta ulterioară a acestor glucoproteine depinde de natura enzimelor următoare, transferaze sau glucozidaze, cu care ele intră în contact în cursul transportului lor spre periferia celulei. Activitatea acestor enzime este iniţiată de secvenţe deosebite de aminoacizi, numite semnal, din moleculele proteinelor.

În cazul în care moleculele proteice intrate în porţiunea cis a canalelor conţin secvenţe activatoare pentru enzimele proteino-kinaze, vor fi transferate resturi de fosfaţi pe moleculele de manoză din poziţia terminală a lanţurilor glucidice laterale ale glucoproteinelor.

Prin aceasta, moleculele de glucoproteine pe de o parte blochează grupările hidroxilice acceptoare ale acestora (închid lanţul) şi împiedică activarea celorlalte enzime transferaze; pe de altă parte, glucoproteinele care conţin resturi terminale de manoză fosforilată urmează să fie dirijate spre a fi înglobate în lizozomi.

Glucoproteinele fosforilate pătrund în lizozomi prin contopirea membranei acestora cu pereţii cisternelor aparatului Golgi.

În cazul în care lipsesc secvenţele activatoare pentru kinaze, se activează o glucozidază care îndepărtează moleculele manozelor situate în poziţii terminale. Lanţurile glucidice astfel prescurtate sub acţiunea diferitelor enzime transferaze urmează să fie cuplate succesiv cu glucozamina, galactoza, fucoza şi, în sfârşit, cu acid neuraminic. Aceste glucoproteine pot fi incluse în structura membranelor ca proteine periferice sau integrate, dar pot fi şi excretate din celulă, ca proteine de export. Atât transportul intracanalicular, cât şi excreţia lor are loc sub forma unor granule înconjurate de porţiuni de membrană, numite vezicule de transport (vezicule Golgi). Ca urmare, acest transport nu este un flux continuu, dimpotrivă, se manifestă prin formarea, deplasarea şi transformarea succesivă a ansamblului veziculelor de transport. Pereţii acestor vezicule intrând în contact cu suprafaţa internă a membranei celulare, se contopesc cu ea. La aceste nivele, membrana celulară se deschide şi conţinutul granulelor se goleşte spre exterior prin degranulare.

2.7. Nucleul celular

2.7.1. Structura nucleului celular

Aproape toate celulele eucariotelor au nuclei care sunt separaţi de citoplasmă prin membrana nucleară cu compoziţie lipidoproteică dublu stratificată, care spre deosebire de membrana celulară dispune de numeroşi pori, unii mai mici, cu diametrul de 35 nm (350 Å) şi alţii mai mari cu diametrul între 100 şi 200 nm (1000-2000 Å). Aceste "diafragme" sunt acoperite

cu nişte capace mobile, fixate de membrană. Prin aceşti pori au loc schimburile de substanţe şi de informaţii între nucleu şi citoplasmă.

În ceea ce priveşte mărimea, forma şi localizarea nucleului, există variaţii mari. Deoarece nucleul are un indice de refracţie diferit de citoplasma înconjurătoare este uşor vizibil în celula vie. Tratarea celulei cu fixatori acizi are ca efect o conturare mai precisă a nucleului. La pH scăzut, coloranţii bazici sunt legaţi rapid datorită prezenţei acizilor nucleici cu grupele lor fosforice. Materialul care leagă coloranţii bazici este numit cromatină sau cariosom.

Pe plan histologic, cromatina se colorează cu coloranţii bazici (May-Grünwald-Giemsa) în violaceu închis. Adeseori cromatina se colorează heterogen, observându-se porţiuni granulare mai întunecate (heterocromatina), iar restul se colorează cu intensitate mai slabă (eucromatina). La multe celule nucleii apar omogeni, din cauza absenţei granulelor.

Majoritatea nucleilor conţin unul sau mai mulţi corpi denşi, uşor demonstrabili în celula vie, în special prin microscopie cu contrast de fază; aceştia sunt nucleolii. ARN din nucleoli se colorează cu verde de metil şi pironină. Această morfologie este caracteristică nucleului în faza de repaus aparent al celulei sau interfază.

Nucleul conţine multe dintre substanţele aflate în citoplasmă; (cunoştinţele asupra componentelor cu greutate moleculară mică sunt reduse datorită distrugerii sau difuzării lor din nucleu în timpul tehnicilor de izolare a nucleului).

În nucleu sunt prezente toate categoriile de macromolecule caracteristice celulelor, adică: ADN, ARN, nucleotide, proteine, lipide etc. În mod obişnuit nucleul nu conţine granule secretoare sau rezerve de material nutritiv; în mod excepţional s-au descris în unii nuclei granule de glicogen.

a) **ADN** este componentul specific al materialului nuclear; aparţine structurii cromozomice şi este prezent în toate tipurile de nuclei. Cantitatea de ADN cromozomic este o caracteristică a speciei şi creşte numai când celula este în preajma diviziunii sau devine poliploidă.

b) **ARN** este găsit în cantitate mare atât în nucleu, cât şi în citoplasmă, în celulele cu creştere rapidă sau cu activitate secretoare intensă. În unele celule staţionare din punct de vedere al multiplicării şi al altor activităţi, ARN este mai slab reprezentat cantitativ şi în cele mai multe celule este în cantitate mai redusă decât proteinele.

c) **Nucleotidele** se găsesc libere în nucleu în concentraţie mai mare în celulele cu diviziune mai frecventă şi în concentraţie mai mică în nucleii celulelor cu metabolism scăzut. În vitro, ele se află sub forma pirofosforică şi în special trifosforică, fiind o predominanţă de ATP faţă de ADP şi AMP. În ţesuturile excizate şi îngheţate la perioade de timp variabile până la 30 min. (5 min., 10 min., 20 min.) s-a observat că ATP scade progresiv şi în aceeaşi măsură creşte ADP şi AMP. Acelaşi aspect s-a observat şi cu derivaţii imidici şi guanozinici.

Predominanța postmortem în țesut a formelor monofosforice se datorează anoxiei care se instalează după moarte. Adeninnucleotidele predomină față de celelalte nucleotide din nucleu, datorită faptului că acestea formează elementele esențiale pentru construcția macromoleculei ADN. Predominanța formelor trifosforice în țesuturile vii apare și mai semnificativă atunci când știm că atacul nucleofilic catalizat de ADN-polimerază se produce numai în condițiile unei grupări trifosforice. Nucleotidele se găsesc în concentrație mare în celulele care se divid frecvent și în concentrație mică în celulele inerte metabolic.

d) **Proteinele.** În cei mai mulți nuclei se găsește o clasă caracteristică de proteine bazice bogate în arginină și lizină, numite histone. Histonele sunt prezente în cantitate echivalentă cu ADN în timpul fazelor de repaus al procesului de sinteză și au o metabolizare mai scăzută în raport cu alte proteine. Ele sunt intim asociate cu ADN cromozomic, unele procedee de extracție având ca rezultat obținerea de complexe care au în constituția lor ADN și histone. Cantitatea de histone din nucleu este caracteristică speciei și nu variază decât în cursul sintezelor premergătoare diviziunii celulare, sau în cursul formării nucleilor poliploizi (nuclei cu seturi multiple de cromozomi) ori a nucleilor polinem (nuclei cu cromozomi giganți, cu multe filamente cromozomiale). În nucleu se găsesc și alte proteine în cantitate mai mare decât histonele, care însă variază considerabil cu tipul de nucleu în cadrul aceleeași specii și cu starea metabolică a celulei. Unele dintre proteine formează echipamentul enzimatic nuclear (polimeraze, sintetaze, nucleotidice etc.), iar altele sunt sintetizate probabil în nucleu și transferate în citoplasmă. S-au pus în evidență și proteine care sunt sintetizate în citoplasmă și transferate în nucleu. Nucleii celor mai multe celule, datorită concentrațiilor mari de proteine și acizi nucleici, au o vâscozitate mai mare ca citoplasma. Cromozomii condensați conțin ADN, histone, o cantitate minimă de ARN și o proteină reziduală insolubilă în soluții saline.

Nucleolul, structura cea mai densă din celule, are o concentrație mare de proteine și relativ mică de ARN. Nucleolul nu are ADN în constituția sa.

Se poate demonstra prezența în nucleu a difosfopiridinnucleotidului și a ionilor de K^+. În metabolismul intranuclear, potasiul pare să aibă un rol deosebit; scăderea lui din mediu scade și oprește încorporarea de C^{14} (Nirski, 1956).

Din cele expuse mai sus rezultă că în nucleu, ca și în citoplasmă, au loc sinteze de proteine, de ATP și procese de respirație celulară. Nucleii sunt foarte dependenți de citoplasmă. Contactul cu mediul fluid aparținând altor citoplasme decât a celei omoloage are ca rezultat deteriorarea rapidă a potențialului metabolic și nucleul pierde aproape instantaneu capacitatea de a funcționa ca aparat genetic (Taylor, 1960).

ADN, purtătorul de informație genetică (materialul genetic celular) este localizat, cu rare excepții, exclusiv în nucleu. ADN poate fi găsit și în citoplasmă, în celulele infectate cu virusuri care conțin ADN sau în celule embrionare în care se observă un material asemănător ADN (Taylor, 1961).

În ultimul caz, aceste polidezoxinucleotide citoplasmatice pot fi considerate ca o rezervă de precursori pentru diviziunea rapidă din cursul dezvoltării embrionare. În nucleul celular, ADN este distribuit în cromozomi. Astfel, nucleul şi cromozomii, în special, sunt structurile morfologice ale materialului genetic.

Înaintea începutului diviziunii celulare cromatina se condensează în filamente diferite, dispuse într-o reţea neregulată. Filamentul individual este numit cromonema, iar reţeaua în totalitate poartă numele de cromonemată. Cromonema reprezintă cromozomul vizibil clar în procesul diviziunii, iar cromonemata totalitatea cromozomilor din nucleu.

Interfaza este numai aparent o fază de repaus, deoarece în această fază are loc duplicarea cromozomială. Moleculele uriaşe ale ADN organizate în gene de-a lungul cromozomilor controlează şi în repaus funcţiile celulare, inclusiv regenerarea şi înlocuirea structurilor consumate şi uzate. Cromozomii nu pot fi văzuţi datorită probabil unei stări de hidratare mai accentuată. La sfârşitul interfazei, cromonemata pluteşte într-un fluid nuclear, numit cariolimfa. În cursul diviziunii celulare (mitozei) întregul material genetic al celulei se dublează şi se transmite celor două celule fiice. Cromatina nucleară difuză se concentrează în cromozomi, care conţin de-a lungul lor secvenţele de ADN dublu spiralate ale genelor succesive. În cursul ultimei faze a diviziunii numărul cromozomilor se dublează şi întregul material genetic al individului se transmite în ambele celule fiice, în forma lui originală şi în cantităţi identice.

Informaţiile depozitate în secvenţele codonilor cuprinşi în dublele spirale ale ADN se transcriu în moleculele ARNm, cu ajutorul ARN-polimerazei specifice. În cursul transcrierii se cuplează numai codonii dintr-o singură semispirală a ADN. Biosinteza ARNm înseamnă faza de transcriere a informaţiei genetice. Prin porii membranei nucleare, ARNm pătrunde în citoplasmă şi ajunge la poliribozomii din reticulul endoplasmatic rugos. Moleculele lungi ale ARNm transmit de la codon la codon ribozomilor informaţia purtată, referitoare la felul aminoacizilor şi secvenţele lor în proteinele sintetizate. Aceasta reprezintă faza traducerii informaţiei genetice. Proteinele sintetizate reprezintă deci produsul diferitelor gene structurale.

Traducerea informaţiilor genetice pe suprafaţa ribozomilor este un proces deosebit de complicat. Această complexitate provine nu numai din existenţa mai multor feluri de ARN (ARNm, ARNt şi ARNr), dar în primul rând din faptul că ribozomii, ca microorganelele biosintezei proteinelor, sunt alcătuiţi dintr-un număr impresionant de mare (52) de feluri de proteine structurale şi funcţionale deosebite, a căror biosinteză la rândul ei este dirijată de acelaşi număr de gene structurale corespunzătoare.

Atât ARNr, cât şi ARNt se sintetizează în nucleu, sub forma unor molecule mult mai mari decât produşii lor definitivi. Aceste molecule mari de ARN sunt fragmentate de către o ribonuclează în produşi mai mici, cu viteza de sedimentare de 18 S şi 28 S pentru ARNr, respectiv 5,6 S pentru ARNt. Este de remarcat faptul că transcripţia ADN-ARN nu este continuă, ci întreruptă.

ARN are pe de o parte capacitatea de autoreproducere, pe de altă parte dispune şi de o funcţie enzimatică ARN-azică. În urma acestor scindări, moleculele mari de ARN, purtătoare de informaţii diferite, se pot fragmenta în porţiuni mai mici, capabile să se reasambleze.

Pe baza acestor considerente, după W. Ford Doolittle, Dryll C. Reammey şi James E. Barnell, este posibil ca în cursul fazei precoce a apariţiei vieţii pe pământ acidul nucleic codificator primitiv să fi fost ARN şi nu ADN, care ar fi apărut mult mai târziu în materialul genetic al vieţuitoarelor.

Condiţia de bază a diviziunii celulare o constituie dublarea prealabilă a materialului genetic din nucleu. Aceasta începe cu despiralarea celor două semispirale ale ADN. Conform complementarităţii bazelor succesive, pe suprafaţa fiecărei semispirale izolate se reproduce spirala corespunzătoare. Aceasta este iniţiată de cuplarea semispiralelor cu nişte fragmente mici de ARN (*Small Nuclear Ribonucleo-Proteins, SNURPS*). Fragmentele sunt produse de o enzimă ARN-polimeraza specifică, numită primază. Secvenţa bazelor acestor SNURPS prezintă o complementaritate caracteristică cu secvenţa bazelor de la începutul uneia dintre cele două semispirale. În acelaşi timp această secvenţă serveşte drept mostră pentru activitatea holoenzimei ADN-polimeraza-III. Moleculele hibridizate (ARN-ADN) urmează să fie descompuse ulterior de către enzima ADN-polimeraza-I.

Despiralarea semispirelor produce în structura ADN un vârtej în sens pozitiv. S-a calculat că, în cursul acestei rotaţii, spiralele se învârtesc chiar de 100 de ori pe secundă. Încordarea produsă se neutralizează prin acţiunea enzimei ADN-giraza la nivelul aşa-ziselor furci de rotaţie. Ca o topoizomerază, enzima orientează grupările fosfatice puternic electronegative ale pentozelor, în aşa fel încât ele pătrund în structura de bază a dublei spirale. Acest mecanism lucrează atât de exact, încât probabilitatea erorilor de transcripţie este de 1×10^{9}-1×10^{10}. Unele antibiotice inhibă în mod specific transcrierea informaţiilor de ADN în ARN. Rimfampicina opreşte sinteza de ARN prin inhibarea subunităţii ß a enzimei ARN-polimeraza. Actinomicina se leagă puternic de spirala dublă a ADN. Prin aceasta, pe de o parte nu permite despiralarea acestuia, pe de altă parte face imposibilă folosirea ei, pentru a fi transcrisă în ARN.

În ciuda transcrierii lineare a codonilor din ADN, în structura genelor, secvenţa acestora nu este totuşi lineară. Aceasta înseamnă că, deşi informaţiile genetice la nivelul ribozomilor se traduc liniar, transcrierea acestora din ADN în ARNm în nucleu este discontinuă. În cursul transcrierii discontinue, la anumite puncte ale spiralei duble ADN succesiunea secvenţei informaţionale a codonilor se întrerupe. După porţiuni similare urmează alte secvenţe care nu se transcriu în ARNm. Aceste porţiuni de interferenţă se numesc introni, iar cele exprimate, transcriptibile, exoni. În timpul transcrierii ADN-ARNm, secvenţele intron se descompun, iar cele exon se transcriu într-o singură structură mică de ARNm.

Fiecare celulă a organismului posedă acelaşi genom, care conţine în total circa 150 000 de gene. Din această colecţie totală, celulele utilizează

numai o parte, în funcţie de necesităţile lor structurale şi funcţionale. În cursul cercetării mecanismelor complicate din cadrul reglării funcţionale ale genelor s-a constatat că în mecanismul transcriptor al informaţiei genetice iau parte un număr de circa 50 de feluri de proteine specifice deosebite. Aceste proteine trebuie să se asambleze pe suprafaţa ADN, înaintea transcrierii de către ARN-polimerază a secvenţei bazelor în ARNm.

La procariote, masele genelor pot fi grupate în două regiuni: regiunea de codificare care codifică secvenţa bazelor şi regiunea reglatoare, sau promotorul, care determină debitul transcrierii.

Regiunea reglatoare (*promoter*) este localizată cu o secvenţă care conţine un număr de nucleotizi mai mic de 10, înaintea regiunii de codificare, într-o prelungire nucleotidică. Enzima ARN-polimeraza se cuplează cu promoter, alunecă până la începutul regiunii de codificare şi începe sintetizarea ARNm. Cu excepţia câtorva gene mari, extinse, debitul formării ARNm depinde de viteza cuplării enzimei cu promoterul.

Este de remarcat faptul că enzima ARN-polimeraza nu poate deosebi secvenţele specifice ale promoterilor sau a altor segmente de ADN, însă în prezenţa unor proteine, numite factori sigma, ARN-polimeraza recunoaşte cu siguranţă secvenţele promoterilor şi evită în acelaşi timp cuplările ineficiente cu alte secvenţe ADN.

La eucariote acest mecanism de reglare a transcrierii informaţiilor genetice este mult mai complicat, deoarece funcţia ARN-polimerazei este condiţionată de trei produşi genetici deosebiţi, sub forma unor proteine specifice. Dintre acestea, una se localizează sub forma promoterului nuclear (*core promoter*) în apropierea regiunii de codificare, indicând punctul de la care va porni funcţionarea ARN-polimerazei. Transcrierea este uşurată de proteinele intensificatoare (*enhancer*) aşezate cu sutele atât în regiunile situate înaintea secvenţelor promoterice, cât şi în urma lor, în unele cazuri chiar şi la distanţe foarte mari de acestea. În schimb proteinele inhibitoare (*silencer*) reduc viteza şi randamentul transcrierilor, având o repartiţie similară cu cea a proteinelor intensificatoare.

Reiese că factorii de activare şi cei de inhibare, în sine, nu pot regla activitatea ARN-polimerazei. Ei funcţionează în realitate numai ca nişte rezervoare pentru factorii adevăraţi de transcriere, care pot fi atât activatori, cât şi represori. Ca urmare, randamentul final al transcrierii este determinat de suma acţiunilor tuturor factorilor reglatori.

Până în prezent s-a reuşit izolarea a 9 factori de transcriere (TF). Ansamblul acestora se cuplează cu regiunea de reglare a unei grupe de gene, numită caseta-GC (*GC-box*) din cauza abundenţei guaninei şi a citozinei din structură. Această regiune stimulează activitatea ARN-polimerazei la nivelul acelor gene, care conţin şi ele asemenea secvenţe. Cu aceasta s-a reuşit identificarea primei proteine specifice, numită proteina nr. 1 a specificităţii (*Specificity Protein Sp1*) care poate să recunoască secvenţe specifice de baze în ADN. La un capăt al acestei molecule se găsesc prelungiri sub formă de deget care conţin zinc (*zinc fingers*) care fixează proteinele activatoare. La

celălalt capăt molecula dispune de o bifurcaţie, care conţine câte un rest glutamic terminal. Aceste terminaţii servesc pentru fixarea unui factor coactivator.

La eucariote, manifestarea definitivă a transcrierilor mai solicită şi prezenţa unor factori transcriptori bazali (BF) dintre care au fost identificaţi până în prezent 7 feluri deosebite, desemnate cu literele A, B, C, D, E, F şi H. Unii dintre aceşti factori bazali contribuie la declanşarea transcrierii, alţii determină randamentul acesteia. Este de remarcat faptul că prin combinările lor diferite, aceiaşi factori bazali intervin în reglarea mai multor gene. Factorul bazal activator se cuplează cu capetele terminale ale proteinei Sp1, care conţine resturi de glutamină prin care realizează cuplarea acesteia cu secvenţa timină-adenină-timină-adenină (caseta TATA) a genei care urmează a fi activată. Din această cauză factorii bazali se numesc proteine fixatoare TATA (*TATA Binding Protein=TBP*). Ulterior s-a constatat că factorii TBP purificaţi nu stimulează transcrierea ADN/ARN. Ei sunt activi numai în prezenţa altor proteine specifice numite coactivatori *(TATA Activating Factor=TAF)*, care acţionează împreună cu TBP. Aceste proteine se fixează pe suprafaţa secvenţelor genelor şi reacţionează la semnalele purtate de proteinele activatoare, care se leagă direct de coactivatorii (TAF) aleşi.

Inhibitorii transcripţiei, numiţi represori, se cuplează temporar cu coactivatorii. Astfel împiedică cuplarea acestora cu activatorii lor. În alte cazuri, ei pot ocoli mecanismul bazal prin oprirea cuplării activatorilor cu proteinele intensificatoare (*enhancer*). Reiese deci că o condiţie de bază a transcripţiei normale de ADN/ARN în prezenţa simultană a tuturor activatorilor şi intensificatorilor o constituie manifestarea la un moment dat a raportului dintre stimulare şi represie.

Pe baza cunoaşterii acestor mecanisme de reglare a transcripţiei genetice pot fi concepute posibilităţi noi ale farmacologiei genetice. Astfel, apariţia unor produse genetice (proteine purtătoare de semnal) poate fi oprită fie prin inhibarea factorilor stimulatori, fie prin stimularea celor inhibitori. De exemplu, produsul anticoncepţional francez RU 468 acţionează prin suprimarea transcripţiei genei care controlează formarea structurilor receptoare citoplasmatice pentru hormonii steroizi. O posibilitate de tratament, încă nerealizată, are la bază faptul că virusul imunodeficienţei umane (HIV) are nevoie pentru replicare de prezenţa unui factor de transcripţie (TF) specific pentru secvenţa TAT. Prin blocarea acestui factor ar putea fi inhibată şi replicarea virusului.

3 Mecanica chimică: structura și proprietățile biomoleculelor

3.1. Apa şi substanţele minerale 43
3.1.1. Apa în organism 43
3.1.2. Sărurile minerale 46
3.2. Vitaminele 49
3.2.1. Vitaminele hidrosolubile 50
3.2.2. Vitaminele liposolubile 52
3.3. Proteinele 54
3.3.1. Aminoacizii, legătura peptidică, structură şi proprietăţi 54
3.3.2. Metodele de separare 62
3.3.3. Proteinele simple şi combinate 65
3.3.4. Funcţiile biologice 67
3.4. Glucidele 69
3.4.1. Structura şi proprietăţile mono-, oligo- şi polizaharidelor 69
3.4.2. Funcţiile biologice 75
3.4.3. Metodele de identificare şi dozare 77
3.5. Lipidele 79
3.5.1. Lipidele complexe şi lipidele simple 80
3.5.2. Proprietăţi 85
3.5.3. Funcţiile biologice 86
3.5.4. Metodele de analiză 87
3.6. Acizii nucleici 91

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

3.1. Apa şi substanţele minerale

3.1.1. Apa în organism

În celula vie, apa nu numai că reprezintă în jur de 75% din masa ei, dar are rol structural, intrând în constituţia ţesuturilor, participă la reacţiile biochimice fundamentale (digestie, reacţii redox, reacţii de eliberare de energie etc.), este solventul multor ioni şi molecule, constituind mediul transportor al proceselor intra- şi extracelulare, aducând în organism substanţele nutritive şi eliminând produşii de excreţie ai diverselor metabolisme, este lubrifiantă, echilibrează temperatura corpului prin eliminarea sa şi constituie un aliment indispensabil ce asigură desfăşurarea diverselor metabolisme. Apa şi produşii ei de ionizare determină structura şi proprietăţile biologice ale multor macromolecule din celule ca proteine, acizi nucleici, ale membranelor, ribozomilor şi altele.

Apa prezintă o serie de proprietăţi fizico-chimice deosebite faţă de analogii săi, hidruri sau lichide obişnuite. Temperatura de topire şi cea de fierbere, căldura de vaporizare, de fuziune şi tensiunea superficială sunt mult mai ridicate şi, deci, la temperatura obişnuită, se găseşte în stare lichidă şi nu de vapori. Această proprietate îi conferă însuşirea de a fi mediu interior. Deci, forţele dintre moleculele apei lichide, coeziunea sa internă sunt mari datorită distribuţiei particulare a electronilor, care conduce la asimetria sa electrică. Atomul de oxigen, puternic negativ, atrage electronii atomilor de hidrogen, dezgolind astfel nucleele de hidrogen. Acestea primesc o încărcătură locală parţial pozitivă, iar atomul de oxigen una parţial negativă. În consecinţă, deşi molecula de apă este neutră (neîncărcată electric), ea este un dipol electric, deoarece centrul sarcinilor negative nu coincide cu cel al sarcinilor pozitive. Funcţie de valoarea sarcinilor din centrele de greutate şi de distanţa dintre ele, apa posedă un moment de dipol. Acesta măsoară gradul de polaritate şi creşte cu mărirea diferenţei în electronegativitate.

La apropierea a două molecule de apă ia naştere o atracţie electrostatică între sarcina negativă a oxigenului uneia din molecule şi sarcina parţial pozitivă a unui hidrogen al moleculei vecine. Astfel se produce o redistribuire a încărcăturii electronice a ambelor molecule, atracţia dintre ele creşte foarte mult, fenomene ce duc la formarea unei legături mai slabe decât cea covalentă, legătura de hidrogen. Molecula de apă are structura unui tetraedru neregulat cu atomul de oxigen în centru şi două legături de hidrogen orientate spre două din vârfurile tetraedrului – legătură de hidrogen intramoleculară. Cum aranjamentul electronic în jurul atomului de oxigen este aproape tetraedric, o moleculă de apă are posibilitatea să formeze legături de hidrogen cu patru molecule de apă vecine – legătură de hidrogen

intermoleculară – de unde rezultă şi coeziunea puternică internă a apei lichide.

Legăturile de hidrogen dintre moleculele de apă se formează atât în apa lichidă, cât şi în cea solidă; dacă în stare solidă, fiecare moleculă de apă este asociată cu alte patru molecule de aceeaşi natură, în stare lichidă numărul lor este uşor mai scăzut.

Apa este un solvent mai deosebit faţă de lichidele obişnuite. Sărurile cristaline sau compuşii ionici se dizolvă în apă, dar sunt aproape insolubili în lichidele nepolare. Această proprietate a apei se explică prin faptul că atracţia electrostatică puternică dintre dipolii apei şi ionii compuşilor ionici, care conduce la formarea ionilor hidrataţi foarte stabili, depăşeşte pe aceea dintre ionii constituenţi ai compusului respectiv şi tinde să compenseze atracţia dintre ionii de semn opus.

Compuşii neionici, dar polari, se dizolvă uşor în apă, datorită tendinţei grupelor funcţionale polare de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă.

Moleculele amfipatice ce conţin atât grupe puternic nepolare, cât şi puternic polare, puse în contact cu apa, sunt solvite sau dispersate sub forma unor particule mici (micele). Cum gruparea polară care s-ar putea hidrata uşor este în minoritate faţă de cea nepolară, insolubilă în apă, tendinţa compusului de a se dizolva în apă este foarte slabă. În această situaţie se formează particule mici în care gruparea polară încărcată electric formează legătura de hidrogen cu molecula de apă, iar grupările nepolare insolubile se retrag în interior. În astfel de particule, apare între grupările nepolare vecine un gen de forţe de atracţie suplimentare, numite interacţii hidrofobe sau *van der Waals*. Acestea produc uneori sisteme de o stabilitate considerabilă.

Indiferent de tipul structurii substanţelor dizolvate în solventul – apă, structura acestora suferă modificări privind valorile diferitelor constante fizice sau conferirea de noi proprietăţi.

Masa hidrogenului fiind mică, electronul său este puternic atras de oxigen, ionul de hidrogen tinde să se desfacă (disocieze) de atomul de oxigen care este legat covalent în molecula de apă. În continuare el încearcă să se lege printr-o legătură de hidrogen de atomul de oxigen al moleculei de apă învecinate. În acest fel se produc ioni de hidroniu (H_3O^+) şi oxidril (OH^-). S-a convenit ca ionul de hidroniu să se reprezinte prescurtat ca ion de hidrogen (proton) H^+, dar nu trebuie uitat că acesta nu există singur ca atare, ci hidratat, cum de altfel se află şi ionul oxidril.

Disocierea apei este un proces reversibil şi se poate reprezenta prin reacţia de echilibru:

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$$

ce se poate exprima prin relaţia:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

în care termenii din paranteze reprezintă concentraţiile ionului de hidrogen, oxidril şi a moleculei de apă nedisociate la echilibru. Ecuaţia este valabilă când vitezele de disociere şi reasociere sunt egale, K reprezentând *constanta de echilibru sau de disociere a apei.*

Apa nedisociată aflându-se în exces, concentraţia sa se poate considera constantă, valoare ce se poate include în constanta de disociere. Se obţine astfel o nouă constantă, *produsul ionic al apei*, numeric egal cu produsul concentraţiei ionilor H^+ şi OH^-. Produsul ionic al apei este constant pentru toate soluţiile apoase, indiferent dacă au dizolvate în ele acizi (donori de protoni) sau baze (acceptori de protoni). În consecinţă, dacă se adaugă H^+ sau OH^-, trebuie să scadă concentraţia OH^-, respectiv H^+, pentru ca produsul ionic să rămână constant.

Apa în organism este distribuită în compartimentele intracelular (apa corporală) şi extracelular (din plasmă, limfă, lichid interstiţial, ţesut conjunctiv, cartilagii, piele, os şi lichide secretoare).

Între lichidele extra- şi intracelular există diferenţe:

– K^+ este ionul principal intracelular, Na^+ extracelular;

– PO_4^{3-} este ionul principal intracelular, Cl^- extracelular;

– concentraţia intracelulară de proteine este mai mare ca cea a plasmei sanguine.

Între apa ingerată şi cea excretată există un echilibru foarte constant. Pierderile de apă sunt dependente de climă (temperatură foarte crescută, climatul uscat), ritmul de activitate (activitate fizică intensă), starea sănătăţii (febră, dietă). Apa se pierde prin piele, plămâni, tractul gastro-intestinal, diaree; ceea ce se pierde prin urină variază direct proporţional cu cantitatea de apă ingerată. Oricum, se cere un volum de apă pentru excreţia anumitor substanţe active osmotic ca ureea şi clorura de sodiu, cantităţile eliminate depinzând de aportul proteic şi al sării.

Menţinerea echilibrului hidric al organismului se face preponderent prin ingerarea de lichide şi prin apa aflată în alimentele solide, în mai mică măsură prin ceea care rezultă în urma oxidărilor moleculare. Adultul normal care trăieşte în condiţii şi ritm mediu de viaţă necesită aproximativ 1500-2000 ml apă/zi. Uneori, în cazuri speciale (febră, vomismente, diaree) necesarul creşte ajungând în unele boli renale chiar la dublarea limitei inferioare. Compensarea pierderilor de apă trebuie respectată cu mare stricteţe, deoarece o variaţie numai de 1-2% a acestei balanţe conduce inevitabil la stări grave şi chiar la moarte.

3.1.2. Sărurile minerale

Organismul uman conţine multe elemente chimice, dar dintre ele doar unele prezintă importanţă fiziologică sau biochimică demonstrată până în prezent. În afara componenţilor majori ai moleculelor corpului (C, H, O, N, S) ce apar în organism prin ingerarea apei şi a alimentelor conţinând glucide, proteine şi lipide, se menţionează şi minerale nutriţionale importante structural şi funcţional, cerute zilnic în raţia alimentară şi anume Ca, P, Mg, Na, K şi Cl. În organism mai există atât elemente (oligoelemente) aflate în cantitate mică în hrană, necesare nutriţiei omului, dar fără funcţii esenţiale, cât şi elemente toxice.

Mineralele organismului formează, cu excepţia Na şi K, săruri sau alţi compuşi puţin solubili. Absorbţia lor este astfel dificilă şi în acest scop se implică proteine specifice de transport. Acestea sunt utile atât pentru transportul mineralelor în sânge, cât şi pentru depozitarea lor în organism. Excreţia mineralelor se face prin urină, sucuri digestive, bilă şi prin scaun.

Cantitatea de elemente minerale necesară zilnic este acoperită în majoritate de alimentaţie. Valoarea concentraţiei unui element în sânge nu reflectă totdeauna cantitatea ingerată, deoarece absorbţia şi excreţia acestuia sunt dependente de o serie de factori. Totuşi, evaluarea nivelului unui element mineral permite cunoaşterea echilibrului între cantitatea sa absorbită, consumată şi depozitată.

Deficienţele unui element mineral sunt de obicei secundare şi au drept cauză afectarea absorbţiei sale sau pierderi excesive. Ingerarea în exces a unui element conduce la simptome toxice, manifestare ce apare când absorbţia se face discontinuu.

Calciul este cel mai abundent element din corpul omenesc. El se află în cantitatea cea mai mare în oase şi dinţi sub formă de hidroxiapatită, fosfaţi, carbonaţi şi alte săruri. Calciul descreşte excitabilitatea neuromusculară, menţine tonusul normal şi excitabilitatea muşchiului scheletic şi cardiac, cuplează stimulul cu secreţia în diferite glande exocrine, are aport în coagularea sângelui, activează unele enzime, prezervă integritatea şi permeabilitatea membranei celulare.

Calciul în ser se găseşte în concentraţie de 9,0-10,6 mg/dl, 4,5-5,3 mEq/l sau 2,3-2,8 mmoli/l. Calciul seric se găseşte ionizat sau liber, care este forma activă fiziologic în proporţie aprox. de 50%, legat de proteinele plasmatice (în special de albumină) aproape 45% şi în complex cu anioni în jur de 5%.

Deficienţa de calciu apare în deficit de vitamina D, hipoparatiroidism, insuficienţă renală, pancreatită şi se manifestă prin tetanie şi tulburări neurologice şi musculare înrudite. Balanţa negativă de calciu conduce la copii spre rahitism, la adulţi la osteomalacie.

Hipercalcemia nu se produce la subiecţii normali în urma ingerării crescute de calciu, căci excesul acestuia nu este absorbit. În aceste condiţii, creşterea Ca^{2+} se însoţeşte de hipertiroidism, intoxicaţiile cu vitamina D,

sarcoidoza, mielomul multiplu, bolile neoplazice ale osului.

Calciul *total* se determină:

– prin precipitare ca oxalat şi titrare cu permanganat de potasiu a acidului oxalic format prin acţiunea acidului sulfuric;

– prin formarea cloranilatului de calciu, care tratat cu EDTA (etilen diamin tetraacetat) ce chelează calciul, eliberează acidul cloranilic colorimetrabil;

– prin titrare cu calceină în prezenţa EDTA-lui, când complexul fluorescent Ca – calceină devine roz corespunzător calceinei libere, în urma chelării calciului cu EDTA;

– flamfotometric, dar cu limitarea datorată interferenţei Na şi K şi a emisiei Ca-lui de către fosfaţi şi sulfaţi;

– prin acţiunea o-crezolftaleinei şi a 8-hidroxi chinoleinei sau a 2-amino-2 metil-1 propanol şi obţinerea unui complex colorat;

– prin spectrofotometrie cu absorbţie atomică.

Calciul ionic se determină:

– colorimetric cu murexid şi mai eficient cu tetrametil murexid;

– cu electrozi ion – selectivi de calciu;

– potenţiometric prin sistem automat, bazat pe senzori în care se utilizează o membrană impregnată cu schimbător de ioni lichid.

Fosforul, după calciu, este cel mai abundent element mineral din organism. Mai mult de 3/4 din fosforul din organismul unui adult (măsurat în fosfor anorganic) intră în constituţia scheletului ca hidroxiapatită. Restul este combinat cu substanţe organice cu roluri vitale ca fosfolipidele, nucleotidele, acizii nucleici, constituenţi ai membranelor şi ai citoplasmei celulare, dar şi sub formă de compuşi importanţi ai rezervei şi schimbului de energie biochimică. În celulă, fosforul apare ca fosfat organic, în ser, în cantitate mică, dar semnificativă, ca fosfat anorganic. În spaţiul extracelular, ionul fosfat circulă liber.

Cantitatea normală de fosfor sanguin este de 2,4-4,7 mg/dl (0,78-1,51 mmoli/l). Copiii în creştere au nivele mai înalte de fosfor, dublând aproape valorile normale.

Deficienţa de fosfor implică un aport insuficient, absorbţie redusă sau eliminare în exces. Aceasta afectează calitatea oaselor şi a dinţilor, produce anomalii celulare.

Hiperfosfatemia se întâlneşte în cazul afectărilor renale, în distrugeri tisulare.

Metodologia determinării ionului fosfat se bazează pe reacţia acestuia cu molibdaţii, când se formează heteropolicompuşi ca fosfomolibdaţii ce se măsoară prin diferite tehnici:

– ultramicrometode unde fosfomolibdatul se determină prin titrare acidimetrică;

– măsurarea directă spectrofotometrică a complexului la 340 nm sau 310 nm;

– măsurarea fotometrică a albastrului de molibden obţinut prin reducerea fosfomolibdatului cu diverşi agenţi reducători;

– stabilizarea culorii cu Fe^{2+} şi tiouree;

– complexarea fosfomolibdatului cu trifenil metan;

– metode enzimatice prin care NADPH rezultat se evaluează prin fluorescenţă sau absorbţie de lumină.

Magneziul reprezintă ca pondere al doilea cation intracelular după potasiu, concentraţia sa în lichidul intracelular fiind de 10 ori mai mare decât în cel extracelular. Peste 50% din cantitatea de magneziu se găseşte în oase, alături de calciu şi fosfor. Magneziul este un activator al diverselor enzime angajate în transferul şi hidroliza grupărilor fosfat (fosfataze, carboxilaze, transfosforilaze, pirofosfataze, hexokinaze) şi este esenţial pentru prezervarea structurii macromoleculare a DNA, RNA şi a ribozomilor. Aproape 3/4 din magneziul seric se găseşte sub formă difuzabilă sau liberă, restul fiind legat de proteine, cu precădere de albumină.

Nivelul seric al magneziului este de 1-3 mg/l (1,5-2,5 mEq/l).

Deficienţa de magneziu prin creşterea nivelelor de calciu, proteine şi fosfat duce la afectarea pereţilor vasculari, tulburări de ritm cardiac, calcifieri arteriale. Scăderea nivelului de magneziu poate rezulta şi prin diaree cronică, pancreatită, alcoolism, vărsături prelungite. Diureticele grăbesc eliminarea de magneziu, în timpul lactaţiei cerinţele de magneziu cresc.

Hipermagnezemia se întâlneşte rar în insuficienţa renală, în acidoză diabetică severă, în boala Addison.

Metodologia veche a magneziului a utilizat precipitarea sa cu un fosfat, după îndepărtarea calciului. Final, fosforul se evalua prin fotometrarea albastrului de molibden sau sub formă de complex molibdo-vanadat. Alte metode care se folosesc pentru determinarea magneziului sunt:

– complexometrie şi fluorimetrie cu acid 8-hidroxi-5-quinolin sulfonic; complexarea cu magon, murexid, eriochrome; se folosesc rar;

– acţiunea galbenului de titan în mediu alcalin cu formarea unui lac roşu pe suprafaţa particulelor coloidale de hidroxid de magneziu;

– spectrofotometrie de absorbţie atomică cu sau fără deproteinizare şi îndepărtarea ionului de fosfat.

Sodiul constituie cationul major al lichidului extracelular şi se asociază cu clorul şi cu bicarbonatul pentru asigurarea reglării echilibrului acido-bazic. Na^+ menţine distribuţia normală a apei şi a presiunii osmotice a lichidelor corporale şi în felul acesta protecţia faţă de pierderea excesivă de umori. De asemenea, el participă la păstrarea echilibrului ionic şi a excitabilităţii neuromusculare. Concentraţia medie normală a sodiului plasmatic este de 142 mEq/l.

Natriul se găseşte în alimentele pe care le ingerăm şi în sarea de bucătărie cu care se găteşte sau se asezonează mâncarea. Plusul de sodiu din cantitatea ingerată se elimină prin urină aproape total şi se poate astfel aprecia.

Lipsa sodiului în organism se poate datora multor cauze: reducerea sării în hrană, poliurie severă, boală Addison, diaree, tubulopatie renală, aport de apă fără electroliţi etc. Ca urmare, apar tulburări cardiovasculare, nervoase, se dezvoltă acizi ce duc la alte complicaţii.

Creşterea concentraţiei de sodiu apare prin tratament excesiv cu săruri de sodiu, eliminări reduse ale acestui ion, aport redus de apă sau pierderi substanţiale pe cale renală (diabet insipid). Acestea duc la deshidratare severă şi leziuni ale creierului.

Analiza sodiului sanguin se face cel mai simplu şi rapid prin emisie flam-fotometrică şi spectrofotometrie de absorbţie atomică. Electrozii ion-selectivi măsoară activitatea ionului, nu concentraţia sa, mărimi înrudite, dar nu paralele. În acest caz trebuie efectuate corecţii sau calibrări necesare raportării rezultatelor în unităţi de concentraţie.

Potasiul este un cation important al lichidului intracelular. Normalul seric al potasiului este de 2,5-5,0 mmoli/l.

Creşterea nivelelor de potasiu seric afectează iritabilitatea musculară, respiraţia şi funcţia miocardică. Cam aceleaşi efecte le prezintă şi existenţa nivelelor scăzute de potasiu.

Rinichiul conservă potasiu pentru organism, nu are un mecanism de a se proteja de pierderile excesive ale sale. În aceste cazuri nu se elimină analog şi sodiu, ci din contră, el se reţine în organism, afectând echilibrul normal al acestor două elemente, ceea ce duce la dereglări funcţionale. Scăzând K^+ intracelular, se utilizează compensator protoni (H^+), ajungându-se, uneori, chiar la acidoză intracelulară. Cu pierderea K^+ se pierd şi H^+, tubulii renali conservă Na^+ pe cheltuiala H^+, mai degrabă decât pe cea a K^+, ceea ce duce la alcaloză extracelulară concomitentă acidozei intracelulare.

Pierderile de potasiu se datorează diareelor, vomismentelor, alcalozei, insuficienţei renale, administrării prelungite de diuretice.

Hiperkalemia apare în oligurie, anemie, obstrucţie urinară, leziune renală, hemoliză, distrugeri celulare, acidoză, catabolism proteic intens.

Metodologia modernă, părăsind vechile variante gravimetrice şi turbidimetrice, utilizează pentru determinarea potasiului metodele flam-spectrofotometrică de emisie şi spectrofotometrică de absorbţie atomică, rapide şi fidele. Activitatea K^+ se poate determina şi cu un electrod ion selectiv, ulterior făcându-se corelaţiile corespunzătoare pentru determinarea concentraţiei sale.

3.2. Vitaminele

Vitaminele sunt substanţe organice pe care ţesuturile umane nu le pot sintetiza şi de aceea trebuie procurate prin raţia alimentară sau în urma sintetizării microorganismelor intestinale. Ele îndeplinesc roluri funcţionale importante, fiind necesare unei creşteri şi dezvoltări normale a organismului. Deşi se folosesc cantităţi mici de astfel de substanţe, fără valoare energetică

sau fără a constitui surse de carbon sau azot, dacă ingerarea lor este sub limita necesară, apar simptome de deficienţă. Vitaminele şi derivaţii lor au uneori rolul de cofactori pentru enzime şi se numesc coenzime.

Clasificarea vitaminelor se face convenţional, după o proprietate fizică, solubilitatea. În acest sens, ele se clasifică în:

– vitamine hidrosolubile cu molecule polare, solubile în apă (vitaminele complexului B, vitamina C);

– vitamine liposolubile cu molecule apolare, solubile în grăsimi (vitaminele A, D, E, K).

3.2.1. Vitaminele hidrosolubile

Vitaminele hidrosolubile sunt aproape toate cofactori ai sistemelor enzimatice sau precursori ai cofactorilor; se sintetizează în plante şi deci se procură din legume.

TIAMINA (Vitamina B_1, Aneurina) are structura de pirimidină substituită, unită printr-o punte metilen de un tiazol substituit. Ea este vitamina precursoare tiaminpirofosfatului, care constituie forma activă, o tiaminpirofosfotransferază ATP-dependentă care răspunde de această conversie. Tiaminpirofosfatul are rol de coenzimă în reacţiile ce transferă o unitate aldehidică activată: decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor şi reacţiile transcetolazice.

Necesarul mediu de vitamină B_1 la adult este de 1,5-2 mg în 24 de ore.

Deficienţa vitaminei B_1 dă tulburări ale metabolismului glucidic şi descreşteri ale activităţii transcetolazice.

RIBOFLAVINA (Vitamina B_2) prezintă o structură heterociclică la care este ataşat ribitolul.

Necesarul zilnic pentru adult al acestei vitamine este de 1,7 mg/24 de ore.

Riboflavina este convertită în celulele mucoasei intestinale în flavin-adenin mononucleotid (FMN) format prin fosforilarea ATP dependentă şi din flavin-adenin dinucleotid (FAD) obţinut prin transferul pe FMN a AMP-lui din altă moleculă de ATP. FMN şi FAD constituie grupările prostetice ale enzimelor oxido-reducătoare flavoenzime sau flavoproteine. Rezultă că riboflavina este precursorul coenzimelor FAD şi FMN.

PIRIDOXINA (Vitamina B_6) funcţionează sub trei forme: piridoxina, piridoxamina şi piridoxalul. Acestea sunt precursori ai cofactorului activ biologic piridoxal fosfat, ce se obţine prin fosforilare în prezenţa ATP-lui şi a enzimei piridoxal kinazei. Necesarul vitaminei B6 este de 2 mg/zi, cerinţele crescând în timpul gravidiei şi al lactaţiei. Piridoxal fosfatul constituie cofactorul multor enzime ce utilizează aminoacizi ca substraturi. Faptul că formează intermediari covalenţi de tip bază Schiff, între porţiunea sa aldehidică şi gruparea α-amino a aminoacizilor, prezintă o mare importanţă pentru funcţia sa de coenzimă, deoarece în acest fel se pot petrece o gamă

largă de transformări ale aminoacizilor (transaminare, decarboxilare, dezaminare, racemizare etc.).

Piridoxal fosfatul intră în structura enzimei prezente la conversia glicogen-glucoză-1-fosfat.

COBALAMINA (Vitamina B_{12}) are o structură complicată, formată dintr-un inel asemănător celui porfirinic, având în centru ionul de cobalt de care este ataşată o grupare cian, ce trebuie îndepărtată înainte ca vitamina să se convertească în forma sa activă.

Cantitatea necesară zilnic de vitamină B_{12} este de 2 μg, aceasta crescând în timpul sarcinii.

Absorbţia în ileon a cobalaminei este realizată sub forma unui complex aşa-numit "factor intrinsec", o glicoproteină formată în mucoasa gastrică. Traversând mucoasa ileală, complexul este clivat şi eliberează vitamina B_{12}. Transportată în ser legată de globulină, se prezintă sub formele active – dezoxi adenozil cobalamina şi metil cobalamina ce se găsesc în ficat, reticulocite şi în celulele măduvei.

Cofactorii cobalaminei sunt necesari atât metilmalonil coenzimei A, izomeraza ce participă în catabolismul izoleucinei şi valinei, cât şi la utilizarea propionil CoA şi homocistein H_4 – folat metil transferaza care catalizează metilarea homocisteinei la metionină. Vitamina B_{12} joacă un rol important în hemopoeză, legat de metabolismul folatului.

Deficienţa vitaminei B_{12} se datorează absenţei "factorului intrinsec" şi conduce la anemia pernicioasă (anemia Biermer).

ACIDUL FOLIC (folatul, acid pteroil glutamic, folacina) are o structură formată din pteridină heterociclică, acid p-amino benzoic şi acid glutamic.

Nevoia zilnică de acid folic este de 200 μg/zi, cerinţele crescând în timpul sarcinii şi lactaţiei. Iniţial, folatul se găseşte în hrană ca poliglutamat, care este clivat înaintea absorbţiei în intestinul subţire de o conjugază intestinală. Coenzimele folatului se comportă ca molecule transportoare ale fragmentelor cu un singur carbon la diferite nivele de oxidare.

Deficienţa de acid folic determină anemia macrocitică, anemia megaloblastică şi tulburări gastrointestinale.

NIACINA (acidul nicotinic) este un derivat pirimidinic, component netoxic al nicotinei din tutun. Cerinţa zilnică de niacină este de 19 mg/zi. Precursorul acestei vitamine este triptofanul, calea de formare necesitând piridoxal fosfatul – forma de coenzimă activă a vitaminei B_6. Porumbul este sărac în triptofan şi niacină; când este folosit ca sursă majoră de proteină se poate ajunge la sindromul de deficienţă de niacină – pelagra.

Niacina este factorul esenţial al biosintezei NAD^+ şi $NADP^+$ cofactori implicaţi în reacţiile biologice redox, reversibile datorită inelului pirimidinic. În formă hidrogenată sau redusă, niacina poate exista în forme rezonante şi este relativ stabilă.

ACIDUL PANTOTENIC (pantotenat, vitamina B_5) este amida acidului pantoic cu β alanina, precursor în biosinteza CoA în care participă ATP. CoA conţine la un capăt al moleculei adenină şi tiol la celălalt. Gruparea tiol

funcţionează ca un purtător al grupărilor acil în reacţiile ce implică oxidarea şi sinteza acizilor graşi, în cele de acetilare şi decarboxilările oxidative în care participă tiamin pirofosfatul. Legătura acil-S prezentă în CoA este de înaltă energie, echivalentă cu cea din ATP.

BIOTINA este din punct de vedere structural un derivat imidazolic sintetizat de microorganismele intestinale, folosit de către enzime de care este legat covalent ca grupare prostetică. Numai biotinholocarboxilaz-sintetaza leagă covalent gruparea carboxil liberă a biotinei de reziduul lizil al apoenzimelor carboxilazelor. Biotinidaza catalizează îndepărtarea biotinei din enzime în decursul turnoverului proteinic, în felul acesta permiţându-se vitaminei să se recicleze în organismul uman.

Necesarul zilnic de biotină este de 150-300 μg.

Biotina acţionează ca o coenzimă în reacţiile de carboxilare care fixează temporar CO_2 şi-l transferă la compuşii ce urmează a se carboxila.

Deficienţa acestei vitamine se poate datora antibioticelor ce ar inhiba dezvoltarea bacteriilor intestinale producătoare de biotină. Ingerarea unei cantităţi crescute de avidină (proteină din albuşul de ou), care având o mare afinitate faţă de biotină frânează absorbţia sa, conduce de asemenea la deficienţa acestei vitamine. În sfârşit, deficienţa carboxilazică multiplă se datorează unui defect al enzimei biotin holocarboxilaz sintetaza ce împiedică ataşarea biotinei de enzimele biotin – dependente.

ACIDUL ASCORBIC (Vitamina C) are o structură asemănătoare unui monozaharid cu o grupare endiol. Necesarul său zilnic este de 60 mg. Vitamina C este o substanţă reducătoare, pierzând uşor atomii de hidrogen şi transformându-se prin oxidare în acid dehidroascorbic. Reacţia este reversibilă şi ambele forme sunt fiziologic active.

Acidul ascorbic funcţionează ca un cofactor şi este necesar în hidroxilarea enzimatică a prolinei la oxiprolină şi pentru sinteza unor hormoni esenţiali în multe funcţii ale corpului (epinefrină şi norepinefrină). Această vitamină protejează celula faţă de radicalii liberi ai oxigenului, acţionând ca un anti-oxidant, uşurează absorbţia fierului şi favorizează utilizarea sa din depozitele din ţesuturi.

Deficienţa de vitamina C conduce la scorbut, iar supradozajul său generează formarea calculilor renali de oxalat de calciu şi afectează defavorabil biotransformarea sau absorbţia altor vitamine (B_{12}) şi medicamente prezente simultan în tractul gastrointestinal.

3.2.2. Vitaminele liposolubile

Vitaminele liposolubile sunt molecule hidrofobe, apolare, cu structură izoprenică. După absorbţie sunt în majoritate transportate prin intermediul chilomicronilor în ficat (vitaminele A, D, K) sau în ţesutul adipos (vitamina E). Ele trec apoi în sânge prin intermediul lipoproteinelor şi cu ajutorul bilei ajung în intestin.

VITAMINA A (Retinolul) este un poliizoprenoid cu un inel ciclohexenil. Esterii retinolului din produsele animale se absorb în intestin; carotenele, existente în vegetale se pot absorbi direct (bila le cere pentru formarea micelelor) sau sunt clivate enzimatic. În acest fel se obţine retinalul (retin aldehida) ce este redus în mucoasa intestinală la retinol, se reesterifică cu palmitat şi se transportă în ficat unde 90% din vitamina A din corp este depozitată.

Necesarul vitaminei A în organism este de 1000 echivalenţi de retinol/zi (1 echivalent retinol = 1 μg retinol = 6 μg β caroten).

Vitamina A are un rol extrem de important pentru vedere; venind în contact cu retina, retinolul se esterifică transformându-se în acid gras. Esterii acidului gras sunt hidrolizaţi şi retinolul se oxidează la retinal, ce formează complexe cu proteine numite opsine. Absorbţia luminii este însoţită de o modificare conformaţională a retinalului.

Vitamina A are şi alte funcţii care nu sunt încă bine lămurite. Acidul retinoic previne o serie de deficienţe în afara celor asociate cu vederea.

Insuficienţa vitaminei A afectează vederea începând cu tulburări ale văzului noaptea, până la xeroftalmie, cheratomalacie şi orbire totală. De asemenea, poate conduce la o formare anormală a keratinei în membranele mucoase, cu creşterea presiunii lichidului cerebrospinal; la bărbaţi pot apărea disfuncţii gonadale şi, la femei, avort. Lipsa totală a vitaminei A duce final la moarte.

COLECALCIFEROLUL (Vitamina D_3) este precursorul hormonului dihidroxicolecalciferolului, reglator al metabolismului calciului şi se formează din 7 dehidrocolesterol. Necesarul său zilnic este de 5 μg. Suplimentarea sa se efectuează când există lipsa razelor solare, deoarece vitamina ia naştere prin acţiunea radiaţiilor u.v. asupra pielii.

Rolul vitaminei D în organism este strâns legat de utilizarea calciului şi fosforului. Deficienţa vitaminei D la copii provoacă rahitismul, ce constă din mineralizarea întârziată a oaselor când pe de o parte absorbţia intestinală a calciului este scăzută şi pe de alta are loc o excreţie excesivă de săruri ale fosforului. La adulţi, boala este cunoscută ca osteomalacie, cu bilanţ negativ al calciului şi demineralizare crescută a oaselor mergând până la deformarea şi fragilitatea lor.

VITAMINELE K sunt naftochinone substituite cu radicali poliizoprenoidici. Menachinona este forma vitaminei K existentă în ficatul de mamifer, filochinona, în plante. Cantitatea zilnică necesară de vitamină K este de 80 μg. Sinteza menachinonei se face de către flora bacteriană intestinală, iar absorbţia o face bila.

Vitamina K este importantă în procesul de coagulare, deoarece este implicată drept cofactor în reacţia de carboxilare a zonei aminoterminale ce conţine reziduuri de glutamat, existentă în unele proenzime. Acestea devin active prin legarea cu ionul de calciu şi tocmai formele ce rezultă în urma reacţiei de carboxilare au o mare afinitate faţă de acest ion.

Deficienţa de vitamină K este legată de sindroamele de malabsorbţie a grăsimilor asociate cu disfuncţia pancreatică. Copiii nou-născuţi pot prezenta astfel de fenomene deoarece placenta este deficitară în ceea ce priveşte transmisia lipidelor.

VITAMINA E (Tocoferol) este un ulei de plante. Dintre cele 7 forme de tocoferoli, α-tocoferolul este cea mai răspândită şi activă biologic. Cantitatea necesară zilnică de vitamină E este de 10 mg, dar cerinţa este legată de ingerarea acizilor graşi nesaturaţi.

Vitamina E se pare că frânează formarea de radicali liberi în acizii graşi polinesaturaţi prin donare de electroni. În acest fel, alături de glutation peroxidază, vitamina E îndepărtează peroxizii formaţi în acizii graşi polinesaturaţi.

Deficienţa de vitamină E este legată de lipsa de protecţie faţă de peroxizi, ce conduce la hemoliza eritrocitelor şi la creatinurie, în urma intensificării slăbirii musculare.

3.3. Proteinele

3.3.1. Aminoacizii, legătura peptidică, structură și proprietăți

Proteinele sunt substanţe organice care joacă un rol crucial în procesele biologice, având şi cea mai mare răspândire în celule. Unităţile lor structurale sunt aminoacizii care, după cum le spune şi numele, conţin cel puţin o grupare amino (NH_2) şi una carboxil (COOH). Structura generală a unui aminoacid constă dintr-un atom central de carbon (C α) pe care sunt grefate covalent o grupare carboxilică, una aminică, un atom de hidrogen şi un lanţ sau catenă laterală numită radical (R).

Aminoacizii sunt molecule amfotere deoarece au grupări acide şi bazice. Acizii monoamino-monocarboxilici există în soluţie ca molecule bipolare, deci cu încărcătură şi pozitivă şi negativă. Gruparea α carboxil se disociază şi se încarcă negativ, gruparea α amino se protonează şi se încarcă pozitiv. Astfel, întreaga moleculă este electric neutră. La pH scăzut, gruparea carboxil se protonează şi sarcina întregii molecule devine pozitivă; la pH ridicat, gruparea amino se deprotonează, sarcina moleculei de aminoacid devenind negativă.

Proteinele pot fi socotite polimeri ai 20 de aminoacizi comuni, varietatea lor datorându-se structurii diferite a radicalilor sau a lanţurilor laterale.

Aminoacizii **alifatici nepolari** includ glicina (glicocolul), alanina, valina, leucina şi izoleucina.

Aminoacizii **aromatici**, la care partea aromatică este ataşată de carbonul

α printr-un carbon metilenic (-CH_2-), cuprind fenilalanina, tirozina şi triptofanul.

Dintre aminoacizii *cu sulf* se menţionează cisteina şi metionina, iar dintre hidroxiaminoacizi, serina şi treonina.

Prolina are drept radical o grupare imino şi este clasificată ca singurul α *iminoacid* dintre cei 20 de aminoacizi.

Aminoacizii menţionaţi au radicalul neîncărcat electric la pH fiziologic, spre deosebire de *acizii monoaminodicarboxilici* ce conţin un radical carboxilic încărcat negativ. Este cazul acidului aspartic şi al acidului glutamic, unde radicalul acid carboxilic este separat de un carbon metilenic, respectiv de doi carboni metilenici faţă de carbonul α. Structurile *acizilor monocarboxilici bibazici* sunt reprezentate de către lizină, arginină şi histidină, la care radicalul conţine un azot ce se poate protona pentru a forma un radical încărcat pozitiv la pH neutru (valabil pentru primii doi aminoacizi, ultimul poate fi sau nu încărcat electric).

Dintre *aminoacizii* amidici se menţionează asparagina şi glutamina.

Cu excepţia glicinei, aranjamentul tetraedric al celor 4 grupări diferite în jurul carbonului, socotit din această cauză asimetric, conferă aminoacizilor *activitate optică* levo- şi dextrogiră (existenţa lor sub forma de perechi stereoizomerice) după cum rotează planul luminii polarizate. Proteinele conţin ca activi numai aminoacizii levogiri.

Există o serie de tulburări clinice datorate unor aminoacizi existenţi în plasmă sau urină. Cele întâlnite în urină poartă numele de aminoacidurii.

Fenilcetonuria implică lipsa fenilalaninhidroxilazei ce catalizează transformarea fenilalaninei în tirozină. Concentraţiile crescute de fenilalanină, fenilpiruvat şi fenillactat cresc în plasmă şi urină. Fenomenul apare în primele săptămâni după naştere şi dacă copilul nu este supus unui regim special, apar manifestări de întârzieri mintale severe.

Cistinuria este un defect transmis genetic în sistemul de transport al membranei pentru cistină şi aminoacizi bazici în celulele epiteliale. Aceşti aminoacizi se acumulează în urină, se pot forma calculi renali care să conţină cistină.

Boala Hartnup transmisă genetic constă din transportul defectuos de către celulele epiteliale al aminoacizilor neutri şi creşterea în consecinţă a concentraţiei acestora în urină.

Sindromul Fanconi este o aminoacidurie generalizată combinată cu hipofosfatemie şi o excreţie crescută de glucoză. Defectul acestui sindrom constă din reabsorbţia anormală de către celulele tubulare a aminoacizilor, fosfatului şi a glucozei.

Aminoacizii, ca unitate structurală de bază a proteinelor suferă o reacţie de deshidratare cu formarea *legăturii peptidice (amidică)*, gruparea α carboxil a unui aminoacid este legată de gruparea α amino a unui alt aminoacid.

Reacţia este puternic endergonică (necesită energie) şi cere hidroliza concomitentă a legăturilor fosfat de înaltă energie.

Repetarea etapelor de deshidratare conduce la formarea unui *polipeptid*. Unitatea aminoacidică se numeşte *reziduu*, care poate fi amino-

sau carboxiterminal. Un lanţ polipeptidic constă dintr-o parte ce se repetă în mod regulat, numit *lanţ principal* şi o *parte variabilă* cuprinzând lanţuri laterale distincte.

Formarea legăturii peptidice îndepărtează două grupări disociabile per reziduu. Cu toate că grupările α amino şi α carboxil N-terminale şi C-terminale au o pondere în formarea şi funcţia proteinei, proprietăţile amfotere ale polipeptidelor sunt determinate în principal de grupele disociabile ale lanţurilor laterale ale aminoacizilor.

Polipeptidele sunt optic active datorită aminoacizilor care le intră în compoziţie.

Structura unor proteine poate prezenta legături disulfidice apărute în urma legăturilor inter- (între lanţuri) sau intralanţ (între porţiunile unui lanţ), prin oxidarea reziduurilor tiolice de cisteină, cu formarea unei legături covalente disulfidice prin care se caracterizează cistina. Secvenţa aminoacizilor într-o proteină este unică, precis definită şi determinată genetic. Cunoaşterea ei elucidează mecanismul de acţiune al proteinei, determină funcţia sa biologică prin corelarea secvenţei de aminoacizi cu mesajul genetic şi structura tridimensională şi o include în patologia moleculară prin eventualele funcţii anormale datorate alterărilor acestei secvenţe.

Structura unui lanţ peptidic este rigidă şi planară. Legăturile C-N nu se pot roti deoarece au un caracter parţial de dublă legătură. Din această cauză, numărul de conformaţii posibile pentru un lanţ polipeptidic este restrâns.

PAULING şi COREY au propus în 1951 două structuri polipeptidice: spirala α şi lama β.

Spirala α are aşezat de-a lungul unei axe lanţul polipeptidic principal în interior şi lanţurile R extinse într-o conformaţie spiralată (fig. 17).

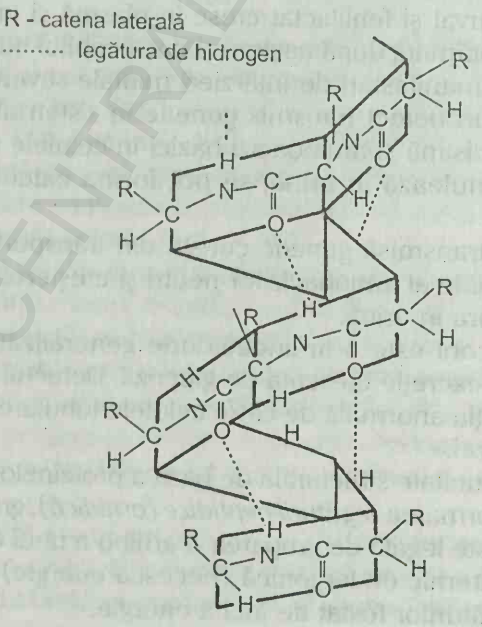


Fig. 17. Modelul spiralei α a proteinelor.

BCU IASI CENTRU

Stabilitatea acestei configuraţii este asigurată de legăturile de hidrogen intralanţ dintre două spire consecutive, situate paralel cu axa longitudinală a spiralei, realizată între atomul de hidrogen ataşat de azotul electronegativ al unei legături peptidice şi oxigenul grupării carbonil al celui de-al 3-lea aminoacid consecutiv. Aranjamentul spiralei dă posibilitatea fiecărei legături din lanţ să participe la formarea legăturii de hidrogen intralanţ.

Spirala α prezintă activitate optică atât datorită prezenţei carbonilor asimetrici, cât şi asimetriei însăşi a spiralei, ce se poate orienta spre dreapta sau spre stânga. Activitatea optică a spiralei se constituie fie din levo-, fie din dextroaminoacizi, nu din amestecul lor (levo cu dextro). Practic, ea este formată din L aminoacizi ce se pot răsuci numai spre dreapta, ceea ce conferă o stabilitate semnificativă.

Nu toate lanţurile polipeptidice pot forma o spirală α stabilă; compoziţia în aminoacizi a lanţului polipeptidic cât şi secvenţa acestora permite existenţa lor sub formă de spirală. În acest sens au pondere interacţiile datorate încărcăturii electrice, mărimea şi ansamblul lanţurilor laterale.

Anumiţi aminoacizi tind să distrugă α-helixul. Printre aceştia se numără prolina (atomul de azot este o parte a unui inel rigid şi nu se poate produce o rotaţie a legăturii N-C) şi aminoacizi cu catene laterale voluminoase şi încărcate electric care interferă fie electrostatic, fie fizic cu formarea helixului.

Trăsăturile importante ale α-helixului se pot sintetiza astfel:

a) α-helixul este stabilizat prin legăturile de hidrogen inter-reziduu, formate între atomul de hidrogen ataşat de azotul peptidic şi de oxigenul carbonilic al reziduului, al patrulea în linie din spatele structurii primare;

b) Fiecare legătură peptidică participă la legătura de hidrogen, aceasta conferind maxim de stabilitate;

c) Un helix α se formează spontan, căci este conformaţia cea mai stabilă şi cu cea mai joasă energie a unui lanţ polipeptidic;

d) Helixul rotat spre dreapta ce apare la proteine este semnificativ mai stabil decât cel rotat spre stânga, când reziduurile sunt L-aminoacizi.

Lama β este mult diferită de spirala α, lanţurile polipeptidice alăturate sunt aranjate în foi pliate, deoarece legăturile C-C sunt tetraedrice şi nu pot exista în linie dreaptă. Lanţurile se întind parte peste parte, legate prin legături de hidrogen, între grupările NH şi CO interlanţ (lanţuri vecine) (fig. 18). Lanţurile laterale sunt aşezate deasupra sau dedesubtul planurilor în zig-zag ale foilor pliate. Aminoacizii adiacenţi sunt la o distanţă mai mare ca în spirala α.

Lanţurile adiacente se pot desfăşura în aceeaşi direcţie de la capătul N-terminal spre cel C-terminal (lama β paralelă) sau în direcţii opuse (lama β antiparalelă).

Literatura mai menţionează un al 3-lea tip de structură, spirala colagenului, care imprimă acestei proteine majore a pielii, oaselor şi a tendoanelor, puterea sa extensibilă.

Structura compactă a proteinelor se datorează în mare măsură inversării bruşte a direcţiei lanţurilor lor polipeptidice, inversări care se pot realiza

prin multe modalităţi, printre care elementul structural numit *rotaţia β (rotaţia inversă)*. Fiind cea mai strânsă rotaţie care o poate face un lanţ polipeptidic, ea se realizează prin legarea grupării CO a unui reziduu polipeptidic printr-o legătură de hidrogen de gruparea NH a celui de-al 4-lea reziduu aminoacidic următor.

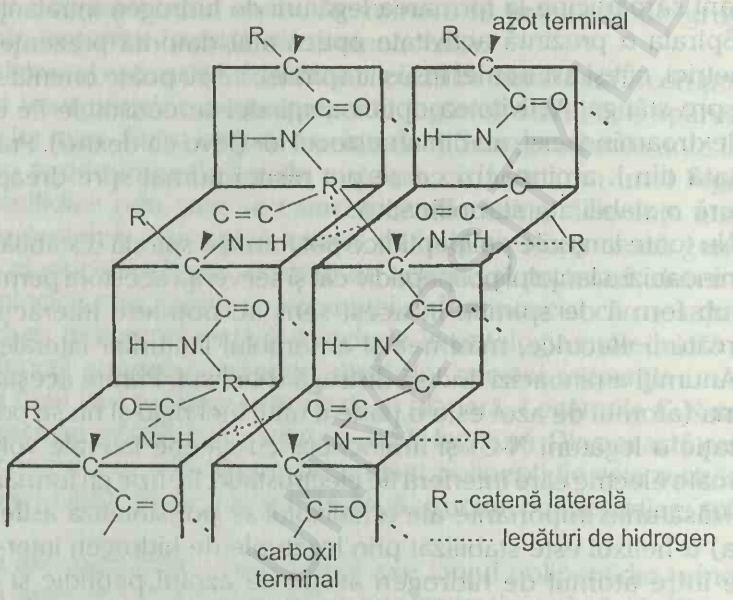


Fig. 18. Modelul lamei ß a proteinelor.

Proteinele în stare naturală au o structură tridimensională unică, ce se exprimă prin conformaţia care de altfel îi furnizează şi funcţia. Studii extinse ale lui ANFINSEN au generalizat unul dintre principiile fundamentale ale biologiei moleculare, prin care secvenţa aminoacizilor unei proteine determină specificitatea conformaţiei sale.

Arhitectura proteinelor se poate clasifica în patru nivele de structură: primară, secundară, terţiară şi quaternară.

Structura primară a proteinelor cuprinde descrierea completă a conexiunilor sale covalente, ce include secvenţa specifică a aminoacizilor, codificată de DNA şi localizarea eventualelor legături disulfidice, dacă sunt prezente.

Structura secundară reflectă conformaţiile lanţului polipeptidic al proteinei, respectiv legăturile covalente ce unesc reziduurile de aminoacizi într-o singură dimensiune din spaţiu. În această structură se formează legătura de hidrogen între gruparea CO a unei peptide şi gruparea NH a altei peptide alăturate. Legăturile de hirogen intralanţ între peptide conduc la formarea de structuri helicoidale ca spirala α sau la rotări ca rotaţia β. Legăturile de hidrogen interlanţ între peptide favorizează structurile extinse ca lama pliată β.

Structura terţiară se referă la aranjamentul spaţial al reziduurilor de aminoacizi, deci la structura globală tridimensională a unităţilor polipeptidice

ale proteinei. Cu alte cuvinte, aceasta arată cum sunt pliate sau înclinate lanţurile polipeptidice în spaţiul tridimensional, pentru a forma o structură compactă. În conformaţia structurii terţiare converg legăturile de hidrogen intra- sau interlanţ, alte legături necovalente între grupările catenei laterale ca cele saline, sau interacţiile inelelor aromatice sau ale punţilor disulfidice intralanţ dintre reziduurile de cisteină.

Structura quaternară. Proteinele cu mai mult de un lanţ polipeptidic prezintă o organizare structurală suplimentară, în care lanţurile polipeptidice se numesc subunităţi. Structura quaternară se referă tocmai la aranjamentul spaţial al unor astfel de subunităţi şi la natura conexiunilor lor. În această structură trebuie luate în consideraţie atât interacţiile necovalente dintre lanţuri, ce formează conformaţia naturală a proteinei, cât şi legăturile disulfidice ocazionale dintre lanţuri. Nu toate proteinele au o structură quaternară.

Recent se vorbeşte de *structura supersecundară* ce se poate considera ca intermediară între structura secundară şi terţiară, prin faptul că unele lanţuri polipeptidice se pliază în mai multe regiuni compacte, ce se pot uni cu un segment flexibil al lanţului polipeptidic. Aceste unităţi globulare compacte, numite *domenii,* de 100-400 reziduuri de aminoacizi, sunt deseori codificate prin părţi distincte ale genelor.

Bazându-se pe secvenţa sa particulară de aminoacizi numită conformaţie nativă, proteina îşi formează o structură unică secundară, terţiară şi quaternară. Plierea structurii primare în conformaţia nativă, de cele mai multe ori spontană, are loc sub influenţa forţelor necovalente, la cea mai joasă valoare a energiei cinetice libere, în condiţii specifice de putere ionică, temperatură, pH al solventului, ce constituie mediul ambiant. În cursul acestui proces apar tranzitoriu şi structuri incorecte. Înving, însă, fragmentele structurate corect, stabilizate de interacţii stereospecifice cu zone mai depărtate, pentru a forma o structură compactă, urmând apoi rearanjările locale care să ducă în final la plierea proteinei.

Conformaţia unui lanţ polipeptidic se caracterizează prin unghiurile legăturilor covalente ce interconectează lanţul aminoacidic: valoarea rotaţiei legăturii N-Cα a lanţului principal este ϕ (fi) şi cea a legăturii C α -C carbonilic este ψ (psi).

O structură secundară regulară implică egalitatea tuturor unghiurilor legăturii ϕ şi ψ din polipeptid. Conformaţiile ce conţin spirala α şi lama β sunt formele cele mai stabil termodinamic ale structurilor secundare regulare. Aceasta nu înseamnă că secvenţa aminoacizilor unei structuri primare proteice nu poate să nu se supună şi altor conformaţii afară de acestea, funcţie de proprietăţile fizice particulare şi de caracteristicile soluţiei în care este solubilizată proteina. Mai mult, proteinele conţin şi zone de structură neordonată, în care nu există egalitatea unghiurilor ϕ şi ψ .

La plierea unei proteine într-o structură conformaţională unică contribuie forţele necovalente, forţe de legătură slabe ce favorizează stabilitatea proteinei. Ele se pot grupa astfel:

a) **Forţe de interacţie hidrofobe.** Introducerea în apă a catenelor laterale nepolare ale structurii polipeptidice impune rearanjarea mai ordonată a moleculelor de apă adiacente, fenomen ce necesită un surplus de energie. Moleculele de apă tind astfel să se relaxeze, ceea ce face ca lanţurile polipeptidice ale proteinelor solubile să se plieze, deci să treacă dintr-o stare dezordonată într-o conformaţie terţiară foarte ordonată. Acestea din urmă devin structuri globulare cu lanţurile laterale hidrofobe înspre interior, cât mai departe de apă, iar cele hidrofile spre exterior, în contact cu apa. Plierea se poate realiza cu fragmente ale spiralei α sau ale lamei β şi va conduce la un maxim de stabilitate termodinamică datorită stării de energie minimă cu care este caracterizată.

b) **Legăturile de hidrogen** se formează când un atom de hidrogen legat covalent de un atom electronegativ (donor) se asociază cu un alt atom electronegativ (acceptor). Grupările peptidice şi alte grupări existente în proteine formează legături de hidrogen cu solventul – apa, ce trebuie rupte înainte de plierea proteinei. Din această cauză, valoarea energiei legăturilor de hidrogen se micşorează, ele nemaiconstituind sursa majoră care contribuie la stabilitatea termodinamică.

c) **Interacţiile electrostatice** au intensitatea direct proporţională cu sarcinile ionului şi invers proporţională cu constanta dielectrică a solventului şi cu distanţa dintre ioni. Intensitatea interacţiei electrostatice în interiorul proteinei este mare, căci constanta dielectrică este scăzută. Fenomenul se petrece invers pe suprafaţa proteinei datorită constantei dielectrice mari a apei. Totuşi, numărul cel mai mare de grupări ionice ale unei proteine se plasează pe suprafaţa proteinei. Ele prezintă, în consecinţă, interacţii slabe cu alte grupări încărcate electric, dar sunt stabilizate prin legături de hidrogen şi interacţii polare cu apa.

d) **Forţele de dispersie van der Waals-London** au un component *atractiv* datorat inducţiei încărcăturilor sau dipolilor privind densitatea electronică a atomilor adiacenţi, când orbitalii electronici se apropie la o distanţă limitată şi un component *repulsiv*, când orbitalii electronici ai atomilor adiacenţi încep să se suprapună. Forţa de repulsie trebuie învinsă la formarea legăturii de hidrogen sau a legăturii covalente dintre atomi, folosind parte din energia de activare a legăturii de hidrogen şi de formare a legăturii covalente.

Interacţia electron π-electron π la apropierea a două inele aromatice până la suprapunere apare ca semnificativă într-o proteină pliată, contribuind şi ea la stabilitatea structurii sale.

Denaturarea proteinelor – modificarea conformaţiei – nu implică desfacerea legăturilor covalente, ci afectează structurile secundare, terţiare şi quaternare, mai puţin sau deloc cea primară, în sensul unei rearanjări. Pierderea, însă, a funcţiei proteinei poate conduce la modificarea configuraţiei native a proteinei, dar nu la distrugerea completă a structurilor secundare, terţiare şi quaternare. Deci, între pierderea funcţiei proteinei şi denaturare, nu se poate spune că există o identitate. Diferenţe mari între

structurile denaturate şi native nu implică neapărat şi diferenţe semnificative ale energiei libere a acestor două tipuri de structuri. Modificarea secvenţei aminoacizilor dintr-o proteină, cu un reziduu de aminoacizi nevariabil esenţial, ce ia parte la o interacţie necovalentă critică, influenţează semnificativ stabilitatea structurii proteice native în favoarea unei conformaţii denaturate.

Denaturarea se poate realiza la temperaturi de peste 60° pentru cele mai multe proteine, prin acţiunea radiaţiilor cu frecvenţă mare, ultraviolete, X, γ, pH-urilor extreme, a ureei, guanidinei în concentraţii mari, a substanţelor tensioactive (surfactanţi), a solvenţilor organici şi a metalelor grele.

Prin denaturare se produce o modificare a proprietăţilor fizice şi fiziologice ale proteinei, se distrug legăturile de hidrogen şi nepolare. Procesul duce la alterarea tensiunii superficiale, pierderea activităţii enzimatice şi pierderea sau alterarea antigenicităţii. Frecvent, proteina denaturată are solubilitate mai mică şi se poate îndepărta prin filtrare. În acest fel, ea se poate deproteiniza tratând-o cu anumiţi acizi (fosfotungstic, tricloracetic sau percloric) sau cu metale grele (Zn^{2+}).

Proteinele sunt macromolecule capabile să recunoască şi să reacţioneze cu o mare diversitate de molecule (mioglobina leagă hemul, anticorpii disting self-ul de non-self, controlul expresiei multor gene se face prin recunoaşterea secvenţelor specifice ale ADN). Această interacţie specifică a proteinelor, cu o aşa mare varietate de molecule, se explică prin capacitatea de a forma suprafeţe complementare şi fisuri pe care se realizează legături de hidrogen, electrostatice şi van der Waals cu alte molecule.

Proteinele prezintă câteva poziţii de legătură care comunică între ele. Dacă se leagă o moleculă într-una din poziţii, aceasta poate afecta altă poziţie. Deci proteinele pot primi, integra şi transmite semnale prin aşa-numitele *poziţii allosterice* ce controlează legarea lor cu alte molecule. Proteinele cu poziţii cuplate între ele prin modificări conformaţionale permit transformarea energiei dintr-o formă în alta.

Solubilitatea variată a proteinelor se datorează resturilor aminoacizilor cu sarcini electrice şi cu grupări polare repartizate pe suprafaţa moleculei. Solubilitatea în apă a proteinei este influenţată de:

– pH-ul mediului ce afectează încărcătura electrică a proteinei;

– sărurile metalelor uşoare care la concentraţii mici o favorizează, iar la concentraţii mari o defavorizează.

Solubilitatea proteinelor creşte cu temperatura în intervalul 0-40°C. Peste această temperatură, instabilitatea lor creşte, se denaturează devenind insolubile la pH neutru.

Acizii minerali concentraţi în cantităţi foarte mici formează precipitate cu proteinele, excesul de acizi redizolvând acestea şi hidroliza putând să apară mai târziu.

Metalele grele acţionează ca precipitanţi ai proteinelor funcţie de concentraţia ionilor de hidrogen, de temperatură şi de prezenţa altor electroliţi. Reactivi ca acidul tricloracetic, acidul tanic, acidul fosfotungstic,

acidul fosfomolibdenic sunt precipitanţi ai proteinelor, când pH-ul soluţiei este în zona acidă a punctului izoelectric al proteinei.

Alcoolul şi solvenţii organici precipită proteinele în special la punctul lor izoelectric.

Temperatura, care pentru proteine trebuie să se plaseze în domeniul 38-75°C, le coagulează. Deşi există factori care le influenţează coagularea, ele se coagulează cel mai uşor la punctul lor izoelectric. Această stare a lor se menţine până când solventul cauzează hidroliza sau altă descompunere.

3.3.2. Metodele de separare

O proteină existentă în lichidele biologice, înainte de a fi evaluată calitativ şi cantitativ, trebuie separată, modalitate ce se poate baza pe diverse proprietăţi ca solubilitate, încărcare electrică, mărime moleculară, legare de o substanţă specifică.

O serie de parametri ca pH, tăria ionică, proprietăţile dielectrice ale solventului, temperatura servesc la separarea amestecurilor de proteine, dată fiind compoziţia lor proprie de aminoacizi care le imprimă comportarea de electroliţi.

Precipitarea izoelectrică. Cum stabilitatea celor mai multe proteine depinde de pH, există o valoare a acestuia, pH-ul izoelectric, la care molecula nu are încărcătura electrică şi nu se deplasează într-un câmp electric, solubilitatea sa fiind minimă. Aducând pH-ul unui amestec de proteine la valoarea pH-ului izoelectric a unuia dintre componenţii amestecului, ele vor precipita şi se vor separa.

Salifierea externă. Solubilitatea proteinelor este influenţată de sărurile neutre, în special în concentraţii mici şi de cele care conţin ioni bivalenţi, deci cu tărie ionică mai crescută decât cei monovalenţi. Tăria ionică prea mare, însă, scade solubilitatea proteinei şi poate produce precipitarea sa în soluţie, fenomen numit "salifiere". Una din explicaţiile acestui proces ar fi îndepărtarea apei de hidratare din molecula proteinei de către concentraţia mare de sare. Oricum, acţiunea sărurilor neutre asupra solubilităţii proteinelor constituie un procedeu de separare a lor, sulfatul de amoniu fiind sarea cea mai frecvent folosită în acest scop. Acest tip de separare creşte cantitatea de proteină urmărită dintr-un amestec complex, ca omogenatele de ţesut sau proba de plasmă sanguină.

Salifierea internă. Solubilizarea în apă a unor proteine implică ioni anorganici. Dializa extensivă faţă de o soluţie cu o concentraţie scăzută de sare poate determina precipitarea anumitor proteine dintr-un amestec, în afara soluţiei.

Fracţionarea cu solvenţi. Solvenţii organici neutri, miscibili cu apa, determină scăderea solubilităţii în apă a proteinelor, până la precipitare. La acest efect participă constanta dielectrică a solventului, care fiind mai mică

decât a apei, determină creşterea forţei de atracţie dintre sarcinile de semn opus şi în consecinţă scăderea gradului de ionizare a radicalilor R a proteinelor ce se află în soluţie apoasă. Aceasta conduce în final la agregare şi precipitare. Separările de proteine prin această metodă se realizează la temperaturi joase, pentru a evita denaturarea proteinelor.

Proprietăţile acido-bazice determinate de numărul şi tipul radicalilor ionizabili din lanţurile polipeptidice permit *separarea proteinelor pe baza încărcăturii lor electrice*.

Curba de titrare acido-bazică a proteinelor explică principiile ce stau la baza separării lor electroforetice. Curba de titrare arată pH-ul izoelectric (molecula nu migrează în câmp electric) care va fi mai mare de pH 7, la un conţinut crescut de aminoacizi bazici şi mai mic de pH 7, când predomină aminoacizii acizi. Punctele izoelectrice au valori, în general, cuprinse între 4, 5 şi 6, 5.

Curba de titrare dă informaţii şi asupra semnului şi mărimii încărcăturii sale electrice la un anumit pH. O proteină la pH peste punctul izoelectric este încărcată negativ, se deplasează spre anod şi sarcina sa creşte cu pH-ul. Analog, la un pH sub punctul izoelectric, proteina va fi încărcată pozitiv şi se va deplasa spre catod.

Pentru separarea şi analiza amestecurilor de proteine se folosesc curent două metode care se bazează pe proprietăţile lor acido-bazice: electroforeza şi cromatografia de schimb ionic.

Variantele metodelor electroforetice au plecat de la *metoda electroforezei în fază liberă* a lui TISELIUS din 1930. Aceasta a fost înlocuită ulterior cu *electroforeza de zonă* cu putere superioară de rezoluţie. Principiul tuturor metodelor electroforetice constă din deplasarea moleculelor cu încărcătură netă, sub acţiunea unui câmp electric. Viteza de deplasare a moleculelor, în aceste condiţii, este determinată de raportul masă/sarcină şi de forma lor. Direcţia de migrare a proteinelor în câmpul electric depinde de încărcătura netă a moleculei, care la rândul său depinde de grupările ionizabile ale sale şi de pH-ul predominant. Mobilitatea electroforetică – mărime care caracterizează migrarea proteinelor într-un câmp electric – se defineşte ca raportul dintre viteza de migrare şi intensitatea câmpului electric. Proteinele au o mobilitate mult mai mică decât ionii simpli, căci se caracterizează printr-un raport sarcină/masă mult mai mic.

Amestecul proteic se imobilizează pe un suport solid, un material hidratat, poros, cu rigiditate mecanică, relativ inert, care minimalizează curenţii de convecţie (hârtia de filtru, acetatul de celuloză, agaroza, silicagelul, alumina, celuloza). Proteinele se separă în zone distincte a căror poziţie şi cantitate se apreciază cu un colorant, densitatea culorii fiind proporţională cu cantitatea de proteină. Se pot utiliza suporturi care permit separarea amestecului de proteine funcţie nu numai de încărcătura electrică, ci şi de mărimea şi forma moleculei (amidon, poliacrilamidă), deoarece acestea au porii de acelaşi ordin de mărime cu moleculele de proteine. Amidonul se obţine dintr-un produs biologic care neputând fi constant reprodus ca

preparat, poate afecta calitatea rezultatelor; poliacrilamida fiind un polimer sintetic nu pune astfel de probleme, condiţiile sale de obţinere putându-se standardiza.

Cum electroforeza zonală pe poliacrilamidă implică în cazul unei proteine denaturarea structurii sale quaternare în subunităţi polipeptidice (monomeri), se foloseşte în acest sens detergentul sodiu dodecil sulfat, încălzirea la 100° şi un reactiv tiol pentru clivarea legăturilor disulfidice. Sodiu dodecil sulfatul formează cu proteina micele intens încărcate negativ, efectul încărcăturii proteinei minimalizându-se până la anulare. Aceste micele migrează spre anod şi poliacrilamida acţionează ca o sită moleculară: moleculele mici migrează mai rapid ca cele mari. Simplitatea şi viteza crescută şi faptul că necesită iniţial o cantitate foarte mică de material biologic (1 μg) fac din această metodă una din cele mai uzitate tehnici de determinare a complexităţii constituenţilor polipeptidici dintr-o proteină.

Focalizarea izoelectrică este o variantă electroforetică cu o putere excepţională de rezoluţie, prin care cu ajutorul acizilor poliaminopolicarboxilici cu pH-uri izoelectrice cunoscute se creează în gel un gradient de pH. Proteinele sunt focalizate în zonele în care pH-ul egalează pH-ul lor izoelectric, mobilităţile lor devenind nule.

Electroforeza capilară zonală liberă, una dintre cele mai moderne variante de electroforeză, se realizează în tuburi capilare cu diametre foarte mici (0,05-0,3 mm) care disipează rapid căldura. Se folosesc voltaje foarte înalte (10 kV), viteza de separare este foarte mare, iar cantitatea necesară de substanţă biologică este de ordinul nanolitrilor.

Cromatografia de schimb ionic utilizează coloane cu răşini sintetice ce conţin grupări fixe, ce pot fi schimbători de ioni cationici şi anionici. La o separare se aleg umpluturi de sarcina opusă sarcinii nete a proteinelor la pH 7. Proteina se leagă de răşina schimbătoare de ioni, cu atât mai strâns, cu cât mai multe reziduuri pot interacţiona cu ea, prin atracţie ionică. Apoi se eluează cu o soluţie salină, ce desface interacţiile electrostatice dintre ea şi proteină. Proteinele cu densitate mică de încărcătură se separă înaintea celor cu o densitate de încărcătură mai mare. Dacă se creşte gradat concentraţia salină (gradient salin), proteinele legate mai slab se eluează înainte de cele legate mai strâns.

Cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC) este analoagă cu cromatografia prin schimb ionic, folosind răşini ce conţin grupări ce interacţionează ionic sau hidrofobic cu proteinele. Ceea ce diferă, este faptul că se foloseşte presiune înaltă, ce determină creşterea vitezei şi a rezoluţiei analizei.

Dializa. O membrană semipermeabilă dă posibilitatea separării amestecurilor de proteine prin dializă, porii săi permiţând să treacă prin ea molecule mici (de ex. apa) şi nu cele mari, ca proteinele.

Filtrarea în gel (cromatografia de excludere moleculară sau sitarea moleculară) are ca principiu trecerea pe baza gravităţii a amestecului de separat dizolvat într-o soluţie tampon, pe o coloană umplută cu un polimer

insolubil), inert, puternic hidratat (Sephadex, agaroză etc.). Proteinele de diverse mărimi ca greutate moleculară pătrund şi ies printre porii umpluturii cu viteze diferite. Moleculele mari se exclud, căci nu pot pătrunde în particulele de gel. În schimb, cele mici intră libere în pori şi se elimină încet, spre deosebire de cele mari care ies primele din coloană. Viteza cu care se deplasează moleculele prin coloană depinde deci, de forma şi mărimea lor.

Ultracentrifugarea. Proteinele, sedimentând în câmpuri centrifugale mari, se pot separa prin metode de centrifugare. Pentru centrifugarea în gradient de densitate sau zonală, se prepară un gradient continuu de densitate pentru o soluţie de zaharoză. Amestecul de separat se depune pe soluţia de zaharoză şi prin centrifugare la viteză mare se produce sedimentarea fiecărei macromolecule de-a lungul gradientului de densitate, cu o viteză funcţie de mărimea şi forma sa. La proteinele de formă similară, cea cu greutate moleculară mai mare, sedimentează prima.

Coeficientul de sedimentare se defineşte ca raportul dintre viteza şi câmpul centrifugal şi se exprimă în unităţi Svedberg (S). Pentru proteine, coeficientul de sedimentare S = 1-200.

Cromatografia de afinitate (absorbţie). Proteinele se pot lega strâns cu o altă moleculă (ligant) printr-o legătură specifică necovalentă. Se foloseşte o coloană de substanţă poroasă cu particule puternic hidratate, de care se ataşează ligantul. Amestecul de proteine se trece pe coloană, proteina vizată se absoarbe selectiv pe ligant şi după îndepărtarea celorlalte proteine prin spălare, se eluează.

Precipitarea cu anticorpi. Anticorpii specifici proteinelor se folosesc pentru a reacţiona cu proteina dorită aflată în amestec, sub forma unui complex Ag-Ac. Acesta se poate îndepărta din soluţie prin centrifugare şi recuperare ulterioară. Atât antigenii, cât şi anticorpii se pot ataşa de umpluturile hidratate şi pot fi folosiţi în cromatografia de afinitate.

3.3.3. Proteinele simple şi combinate

Proteinele, cele mai răspândite molecule organice din celule, esenţiale tuturor aspectelor structurii şi funcţiei celulare, sunt macromolecule cu greutate moleculară între câteva mii şi peste un milion.

După aranjarea în spaţiu a grupărilor substituente, respectiv după conformaţie, proteinele pot fi fibrilare şi globulare.

PROTEINELE FIBRILARE, rezistente fizic, sunt insolubile, extracelulare, cu rol de susţinere în ţesutul conjunctiv şi formate din lanţuri polipeptidice paralele în lungul unei singure axe, care duc la formarea de filamente sau foi.

PROTEINELE GLOBULARE, din contra, sunt uşor solubile, intracelulare, au lanţurile polipeptidice pliate compact în forme sferice.

Această împărţire, însă, nu este netă pentru unele proteine, ele prezentând proprietăţi şi dintr-o categorie şi din cealaltă.

Un alt criteriu de clasificare a proteinelor este compoziţia lor şi din acest punct de vedere ele pot fi SIMPLE (pure), formate doar din aminoacizi şi CONJUGATE (combinate) când conţin pe lângă aminoacizi şi alţi compuşi organici sau anorganici.

În cadrul proteinelor SIMPLE intră cele două clase de PROTEINE FIBRILARE şi GLOBULARE, care pot avea şi subclase.

PROTEINELE FIBRILARE formează grupul heterogen al scleroproteinelor în care intră colagenul, elastina şi keratina. Colagenul este stabil şi rigid datorită cantităţii crescute de prolină şi hidroxiprolină ce o conţine. Elastina, asemănătoare colagenului, conferă elasticitate fibrelor. Keratina este rigidă datorită cisteinei ce permite formarea de punţi disulfidice.

PROTEINELE GLOBULARE cuprind patru subclase. Protaminele au greutăţile moleculare cele mai mici (câteva mii) şi conţin predominant acizi diaminomonocarboxilici. Ele sunt solubile în diverşi solvenţi, nu coagulează şi intră în constituţia celulelor germinale mature. Histonele cu greutate moleculară ceva mai mare (10 000-20 000) au în constituţia lor predominant aminoacizi bazici. Ele sunt în general solubile, dar precipită cu amoniacul, coagulează şi se află în celulele germinale imature şi în sângele nevertebratelor. Albuminele au greutate moleculară aprox. de 60 000, sunt foarte solubile în apă, dar precipită în soluţie saturată de sulfat de amoniu şi se coagulează uşor. Ele conţin puţin glicocol. Globulinele sunt insolubile în apă şi solubile în soluţii saline, acide sau bazice diluate şi au greutatea moleculară aprox. de 150 000.

PROTEINELE CONJUGATE au în compoziţia lor o parte, în afara aminoacizilor, care se numeşte grupare prostetică. În funcţie de aceasta pot exista nucleoproteine, lipoproteine, fosfoproteine, metaloproteine, glicoproteine şi cromoproteine.

Nucleoproteinele conţin ca grup prostetic acizii nucleici şi apar în toate ţesuturile organismelor animale. În citoplasmă sunt asociate cu ribozomi la nivelul cărora are loc biosinteza proteinelor. Virusurile, cromatina, conţin cantităţi mari de nucleoproteine. Aceasta dovedeşte aportul lor în diviziunea celulară şi în transmiterea caracterelor ereditare.

Lipoproteinele au ca grup prostetic lipide (colesterol, fosfolipide, gliceride, acizi graşi).

Fosfoproteinele au gruparea prostetică constituită din restul fosforil ($-PO_3H_2$) care poate să fie prezent permanent la o proteină (cazeina) sau poate oscila ca prezenţă, datorită unui mecanism general de reglare al funcţiilor proteinelor. Deşi conţinutul lor în acid fosforic este redus, ele au caracter acid; sunt insolubile în apă şi acizi şi solubile în alcalii. Dintre fosfoproteinele mai importante se menţionează cazeina din lapte, vitelina, vitelenina şi fosvitina din gălbenuşul de ou.

Metaloproteinele au grupul prostetic constituit dintr-unul sau mai mulţi atomi de metal ce sunt legaţi de resturile de aminoacizi din partea proteică

a moleculei. Unele dintre ele transportă metale (transferina pentru fier, ceruloplasmina pentru cupru), altele le depozitează (feritina pentru fier) şi o altă categorie sunt proteine enzimatice (ascorbatoxidaza are cupru, anhidraza carbonică are zinc).

Glicoproteinele se socotesc proteine conjugate cu peste 5% grup prostetic zaharide, cum ar fi monozaharidele ca atare (manoza, galactoza, xiloza, glucoza, fructoza), acizii uronici (D-glucuronic), aminozaharurile (glucozamina, galactozamina), sau derivaţii aminozaharurilor (acidul sialic, acidul neuraminic).

Cromoproteinele conţin grupări prostetice substanţe colorate, acestea fiind unite prin legături saline de partea proteică. Unele cromoproteine transportă oxigenul în organism (hemoglobina), altele sunt pigmenţi vizuali (rodopsina) sau enzimele proceselor oxido-reducătoare (peroxidaza, citocromii, catalaza etc.).

3.3.4. Funcţiile biologice

Funcţia celor mai multe proteine este determinată de structura şi de modificările ei. Numai aprofundând modificările ce au loc în structură se poate înţelege modul în care proteinele îşi exercită funcţia.

Funcţiile proteinelor pot avea caracter dinamic şi caracter structural.

A. FUNCŢIILE DINAMICE cuprind:

a) *Cataliza transformărilor chimice.* Cele mai multe reacţii chimice ale sistemelor biologice sunt catalizate de macromolecule numite enzime, care sunt proteine cu acţiune catalitică deosebit de crescută. Spre deosebire de catalizatorii chimici, enzimele nici nu se consumă şi nici nu se produc în cursul unei reacţii, nu determină producerea reacţiilor; cu alte cuvinte, ele nu alterează constantele de echilibru ale reacţiilor care le catalizează. Aproape toate reacţiile chimice ce au loc în organismele vii şi implică legătura covalentă sau clivarea, necesită drept catalizator o enzimă specifică, pentru ca să se desfăşoare la o viteză compatibilă cu viaţa. Deci proteinele determină modelul transformărilor chimice al sistemelor biologice.

b) *Transport şi depozitare.* Unele proteine transportă molecule mici sau ioni şi le depozitează. Astfel hemoglobina transportă oxigenul în eritrocite, mioglobina transportă oxigenul în muşchi, transferina transportă fierul în plasmă şi îl depozitează în ficat sub forma unui complex cu feritina. Albumina serică leagă acizii graşi şi îi transportă între ţesutul adipos şi alte ţesuturi. Lipoproteinele plasmatice transportă lipidele între intestin, ficat şi ţesuturi adipoase. Alte proteine transportă hormoni în sânge de la locul de sinteză la locul acţiunii, numeroase medicamente şi compuşi toxici sunt transportaţi, legaţi de proteine; alte proteine au funcţie de depozitare a aminoacizilor, fie

ca substanţe nutritive, fie ca unitate de construcţie a embrionului în creştere (ovalbumina, cazeina etc.).

c) *Protecţia imună*. Sistemul imun umoral secretă imunoglobuline solubile sau anticorpi (Ac) care sunt proteine specifice care recunosc şi se combină cu substanţe străine antigenice. Răspunsul imun, cuprinzând procesele ce conduc la îndepărtarea antigenelor (Ag), protejează în felul acesta organismul de infecţiile bacteriene şi virale.

d) *Controlul creşterii şi diferenţierii*. Controlul informaţiei genetice este esenţial pentru creşterea şi diferenţierea celulelor. Organismele superioare realizează aceasta prin proteinele factor de creştere. Astfel, mulţi hormoni (de creştere, insulina) şi histone ce sunt proteine, se asociază cu acidul ribonucleic, controlează şi ordonează transcrierea şi translaţia genelor. Proteinele funcţionează, deci, în celule ca senzori care controlează fluxul energiei şi materiei.

e) *Contracţia musculară* se datorează mişcării de alunecare a filamentelor proteice. Muşchii striaţi sunt formaţi din celule foarte specializate ce sunt capabile de contracţie.

f) *Generarea şi transmiterea impulsurilor nervoase*. Răspunsul celulelor nervoase la stimuli specifici este mediat de proteinele receptoare (rodopsina este proteina fotoreceptoare a celulelor retinei).

B. FUNCŢIILE STRUCTURALE, care oferă structura şi forma organismului uman, cuprind:

Proteinele structurale, fibroase şi insolubile în apă, formează ligamentele (ca elastina), părul (cum este keratina), coagulează sângele (ca fibrina), prevenind pierderile de sânge din sistemul vascular, furnizează matriţa pentru os şi ţesutul conjunctiv (cum este colagenul), care constituie şi proteina majoră a organismului uman. Colagenul, proteina structurală ce se găseşte în toate ţesuturile şi organele, se prezintă sub diverse forme structurale, ce se adaptează diverselor necesităţi tisulare. Cartilagiul conţine pe lângă colagen şi glicoproteine ce imprimă secreţiilor mucoase şi lichidului sinovial din articulaţii calitatea de a fi lubrefiante.

La baza tuturor acestor funcţii ale proteinelor stau numai cei 20 de aminoacizi, cu sau fără o activitate biologică şi fără acţiune toxică. Ceea ce conferă proteinelor o activitate biologică specifică este conformaţia lor tridimensională determinată la rândul ei de secvenţa specifică de aminoacizi din lanţul(rile) polipeptidic(e).

Funcţia biologică a proteinei este specifică datorită unicităţii formei structurale tridimensionale, respectiv a conformaţiei sale. Funcţia proteinei se poate, în consecinţă, altera ca urmare a unei modificări structurale a sa. Hemoglobinopatiile constituie un exemplu în acest sens, ele conducând la o boală genetică în care subunităţile de globină ale hemoglobinei suferă mutaţii. Sindromul Marfan este cauzat de modificarea unui singur aminoacid într-o proteină a ţesutului conjunctiv elastic, fibrilina. De asemenea, fibroza

cistică se datorează absenţei unui aminoacid din domeniul de legătură cu ATP a unei proteine ATP dependente.

3.4. Glucidele

3.4.1. Structura și proprietățile mono-, oligo- și polizaharidelor

Alături de proteine, acizi nucleici şi lipide, glucidele constituie una din cele patru clase majore de biomolecule. Chimic, ele sunt compuşi aldehidici sau cetonici cu grupări hidroxil.

Glucidele se clasifică în două grupe:

I. Monozaharide, cele mai simple glucide, cu compuşi complecşi ce derivă din ele şi se formează prin unirea moleculelor cu legături glicozidice. În această categorie se includ dizaharidele ce se pot hidroliza în două monozaharide, oligozaharidele ce sunt polimeri compuşi din 2 până la 10 unităţi monozaharidice şi polizaharidele ce sunt polimeri compuşi din mai mult de 10 monozaharide.

II. Aldoze şi cetoze, cum le spune şi numele, după grupul reactiv aldehidă sau cetonă pe care îl conţin.

Nomenclatura monozaharidelor se face cu numărul de carboni ca prefix, urmat de sufixul „oză". Formula generală este $C_nH_{2n}O_n$ unde "n" este numărul de carboni. Carbonii sunt numerotaţi secvenţial şi gruparea aldehidă sau cetonă este la carbonul cu numărul cel mai mic posibil. Pentru a desemna compusul, se poate combina nomenclatura monozaharidului cu a grupării reactive.

Structura glucidelor poate fi de lanţ deschis sau ciclică. Toate monozaharidele (glucide simple) conţin cel puţin un carbon asimetric (carbon legat de 4 atomi sau grupe de atomi diferiţi) ceea ce le conferă faptul că sunt enantiomeri activi optic. Cum cele mai simple monozaharide sunt triozele (gliceraldehida) cu două forme optic active L şi D, restul glucidelor se consideră derivate din gliceraldehidă. Prefixele D şi L se referă la atomul de carbon asimetric cel mai depărtat faţă de carbonul carbonilic.

În formele de lanţ deschis există o serie de compuşi cu aceeaşi formulă chimică, numiţi izomeri:

– optici, ce sunt la fel în raport cu atomii legaţi împreună, dar diferă în orientarea acestora în spaţiu;

– epimeri, izomeri cu conformaţii diferite numai la un singur atom de carbon;

– enantiomeri, izomeri cu direcţii diferite ale planului luminii polarizate (la dreapta, compus dextrorotator şi la stânga levorotator).

Formele de lanţ deschis pot implica formarea semiacetalilor lineari sau ciclici. Semiacetalii intermoleculari sunt compuşi lineari nestabili, ce apar în urma reacţiei unui alcool cu o aldehidă. Semiacetalii ciclici se pot forma prin reacţii intramoleculare similare.

Formele ciclice cuprind:

a. structurile în inel ce pot fi de 5 atomi (4C+10) sau de 6 atomi (5C+10); pentozele formează inelul de 5 atomi numit furanoză şi hexozele inelul de 6 atomi numit piranoză;

b. atomi de carbon anomerici care sunt atomi asimetrici noi creaţi prin ciclizarea ce are loc la legătura carbonului cu oxigenul în urma formării semiacetalului; dacă hidroxilul carbonului anomeric este sub planul inelului, este în poziţia α, deasupra planului inelului în poziţia β; α şi β sunt, deci, două forme stereoizomere;

c. mutarotaţie, proces prin care α şi β glucidele se schimbă în soluţie lent, într-un amestec echilibrat al ambelor forme.

Monozaharidele sunt compuşi solizi, cristalizaţi, solubili în solvenţi polari datorită numărului mare de grupări hidroxil din moleculă. Reactivitatea lor chimică deosebită se datorează grupărilor funcţionale cetonă C=O şi hidroxil -OH. Formele ciclice coexistă în soluţie cu formele aciclice. Prezenţa unui reactant specific grupării cetonă deplasează echilibrul spre forma aciclică, în timp ce reactanţii specifici grupării hidroxilice spre cea ciclică.

Monozaharidele sunt stabile la fierbere cu acizi minerali diluaţi. Soluţiile acide concentrate determină deshidratarea glucidelor cu producerea de furfurali, derivaţi aldehidici de la furan care condensează cu fenolii, conducând la produşi coloraţi utilizaţi uneori la punerea în evidenţă a glucidelor.

Soluţiile diluate de baze conduc la temperatura camerei la o rearanjare în jurul carbonului anomeric şi a carbonului adiacent, fără afectarea substituenţilor celorlalţi atomi de carbon. La temperaturi crescute sau în concentraţii mari, bazele provoacă glucidelor simple rearanjări complexe, fragmentări sau polimerizări.

Monozaharidele la 100°C şi în soluţie slab acidă reacţionează cu un exces de fenilhidrazină, formând fenil osazone insolubile în apă şi uşor cristalizate.

Monozaharidele se reduc, dând naştere la polialcoolii corespunzători, reacţie catalizată în organism de enzime NADH dependente. Ele se şi oxidează la gruparea carbonil cu formare de acizi aldonici sau la gruparea alcool primar, când se obţin acizi uronici.

Condensarea monozaharidelor cu substanţe conţinând grupări amino duce la formarea de compuşi asemenea bazelor Schiff. În acest fel se formează în organism proteinele glicozilate.

Prin esterificare cu acid fosforic, monozaharidele se menţin în celulă şi în metabolizarea lor ulterioară.

Abilitatea glucidelor de a forma esteri glucidici prin acetilare cu clorura de acetil indică prezenţa grupărilor alcool. Numărul total de grupări acil ce se pot forma dintr-o moleculă de glucid este o măsură a numărului de astfel

de grupări alcool. De asemenea, aceleaşi grupări pot fi şi metilate. Gruparea hidroxil de la un carbon anomeric poate forma metil glicozide ce sunt acetilate. Celelalte grupări hidroxil necesită condiţii mai drastice de metilare, în acest caz formându-se metil-esteri şi metilarea fiind de această dată exhaustivă.

Gruparea OH semiacetalică existentă în compoziţia monozaharidelor poate forma cu alţi compuşi ce conţin o grupare OH, oxigen-eteri numiţi glicozide. Acestea se pot prezenta sub formă de anomer α sau β. Eterificarea realizată cu gruparea OH a altei glucide duce la formarea de oligo- şi polizaharide.

Monozaharidele sunt cele mai simple glucide, aldehide sau cetone, ce au două sau mai multe grupări oxidril. Cele mai mici sunt cele cu n=3, gliceraldehida (aldoză) şi dihidroxiacetona (cetoză). Glucidele cu 4-7 atomi de carbon sunt tetroze, pentoze, hexoze şi heptoze. Dintre hexoze se menţionează ca importante D-glucoza (aldoză) şi D-fructoza (cetoză). Aceste hexoze aparţin seriei D deoarece configuraţia lor absolută a C 5 este analoagă cu a D-gliceraldehidei. În soluţie, lanţurile deschise ale glucozei şi fructozei ciclizează în inele. Aceasta se petrece ca urmare a reacţiei dintre gruparea aldehidică a glucozei de la C 1 şi gruparea hidroxil de la C 5 când se formează un semiacetal intramolecular, inel glucidic cu 6 atomi, piranozic, similar piranului.

Analog, gruparea ceto de la C 2 a fructozei reacţionează cu gruparea hidroxil de la C 5, ducând la formarea unui semiacetal intramolecular cu 5 atomi, furanozic, similar furanului.

Fructoza formează şi inele piranozice care predomină când se află ca atare, forma furanozică fiind forma principală a derivaţilor săi. Glucide cu 5 atomi de carbon ca D-riboza şi D-dezoxiriboza formează inele furanozice.

În apă formele α şi β a D-glucopiranozei se interconvertesc, rotaţia specifică se modifică până se atinge o valoare de echilibru, compusul suferind fenomenul de mutarotaţie. Acelaşi fenomen se petrece şi cu formele furanozice şi piranozice ale fructozei.

După HAWORTH, conformaţia inelelor piranozice şi furanozice nu poate fi planară datorită geometriei tetraedrice a carbonilor lor saturaţi. Inelele piranozice adoptă conformaţia de scaun şi barcă. Substituenţii atomilor de carbon din inel pot fi axiali şi ecuatoriali. Legăturile axiale sunt aproape perpendiculare cu planul mediu al inelului; substituenţii axiali apar deasupra şi dedesubtul acestuia şi în afara celor constituiţi din atomi de hidrogen ce se împiedică steric unul pe altul, dacă apar pe aceeaşi parte a inelului. Legăturile ecuatoriale sunt aproape paralele cu planul mediu al inelului; substituenţii ecuatoriali apar la periferie şi au mult mai mult spaţiu.

Având toate poziţiile axiale ocupate de hidrogeni, grupările mai voluminoase OH şi CH_2OH la periferie şi deci împiedicarea sterică mică, forma scaun a β-D-glucopiranozei este predominantă.

Nici inelele furanozice nu sunt planare. Ele se împăturesc în aşa fel încât 4 atomi sunt coplanari şi al 5-lea se află la 0,5 Å de acest plan. Se

vorbeşte în acest caz de forma anvelopă, datorită similarităţii cu o anvelopă deschisă cu partea răsfrântă din spate ridicată. Inelele furanozice putându-se interconverti în diferite forme conformaţionale dovedesc că sunt mult mai flexibile ca inelele piranozice.

Semiacetalii care reacţionează cu alcooli şi dau naştere la acetali, dacă sunt înlocuiţi cu glucide, duc la formarea prin analogie de acetali, denumiţi glicozide.

Între C 1 al glucidului şi oxigenul alcoolului se formează legătura glicozidică specifică, o oxigeno-legătură glicozidică. Dacă reziduul glucidic este glucoza, derivatul este un glucozid; dacă este fructoza, derivatul este un fructozid, similar un galactozid. Când catena laterală (R) este altă glucidă, glicozidul este un dizaharid; în cazul în care catena laterală este deja un dizaharid, glicozidul este un trizaharid ş.a.m.d.

Legătura glicozidică este stabilă faţă de acţiunea bazelor, dar prin fierbere cu acizi se obţin monozaharidul şi alcoolul în stare liberă. Glicozidele sunt hidrolizate şi de enzimele numite glicozidaze, diferite ca acţiune în funcţie de tipul de legătură glicozidică (sau β), de structura unităţilor monozaharidice şi de structura alcoolului. Forma furanozică sau piranozică a unui glicozid se poate stabili prin degradarea oxidativă cu acid periodic care clivează compuşii 1,2-dihidroxi.

S-a convenit ca legăturile glicozidice să se denumească prin citire de la stânga la dreapta.

Cele mai importante dizaharide sunt sucroza (zaharoza), lactoza şi maltoza, localizate pe suprafaţa exterioară a celulelor epiteliale de pe intestinul subţire.

Sucroza ce se găseşte în trestia de zahăr sau sfeclă rezultă din legătura α glicozidică formată între C anomeric al glucozei şi un reziduu al fructozei, deci are o legătură α-1,2 glicozidică. În contrast cu legăturile celor mai multe glucide, puntea de oxigen între glucoza şi fructoza din sucroză este între carbonii anomerici. În consecinţă, ea nu conţine nici o grupare aldehidică sau cetonică liberă şi deci nu este o glucidă reducătoare, nu prezintă mutarotaţie şi nu formează cu fenilhidrazina osazone. Hidroliza sa, care duce la glucidele din care s-a format, este catalizată de sucroză (invertază) şi are loc mult mai rapid decât celelalte dizaharide. Această reacţie mai este numită şi inversie, deoarece este însoţită de schimbarea sensului de rotaţie optică, de la dreapta la stânga. Amestecul echimolar de glucoză şi fructoză format se mai numeşte zahăr invertit.

Lactoza, dizaharidul laptelui este format din galactoză şi glucoză unite prin legătură glicozidică β 1, 4. Hidroliza sa are loc sub acţiunea lactazei la om şi a β-galactozidazei la bacterii.

Maltoza cuprinde două unităţi glucidice unite prin legătura α-1,4-glicozidică. Ea conţine un atom de carbon anomeric neataşat, ce poate avea configuraţia α sau β. Totuşi, legătura ei glicozidică trebuie să fie de configuraţie α-1,4-glicozidică. Maltoza este o glucidă reducătoare, apare prin hidroliza amidonului şi se hidrolizează în glucidele componente prin acţiunea maltazei.

Legătura glicozidică prezentă în polizaharide (glicani) cu masă mare moleculară conduce prin hidroliză totală la monozaharide sau derivaţi ai acestora. Aceştia pot fi homo- sau heteroglicani, după cum sunt rezultaţi în urma policondensării unui singur tip de unitate structurală sau a mai multor tipuri. Glicanii îndeplinesc roluri structurale sau de depozitare a rezervelor energetice. Astfel, forma de rezervă a glucozei din plante, **amidonul**, este homoglicanul cel mai răspândit. El este constituit din două componente:

– Amiloza, polimer linear neramificat de unităţi α-D glucoză, într-o secvenţă repetată de legături α-1,4-glicozidice; ea nu este cu adevărat solubilă în apă, dar formează micelii hidratate ce dau coloraţia albastră cu iodul; formează structuri helicoidale, pasul helicei cuprinzând 4-5 resturi glucozil.

– Amilopectina, polimer al α-D-glucozei, cu legături de bază α-1,4-glicozidice şi punctele de ramificaţie cu legături α-1,6-glicozidice ce apar la intervale de aprox. 25-30 reziduuri de α-D-glucoză şi conferă moleculei o structură ramificată care conduce la o moleculă de tip globular, foarte condensată; nu este solubilă în apă, formează soluţii coloidale sau micelare ce dau cu iodul coloraţie roşie.

Amilopectina şi amiloza sunt rapid hidrolizate de către amilază în două moduri. Amiloza poate fi hidrolizată de α amilaza prezentă în salivă şi sucul pancreatic şi are rol în digestia amidonului în tractul gastrointestinal. Se hidrolizează în acest mod legăturile α (1→4) la întâmplare, rezultând un amestec de glucoză şi maltoză libere; ultima nu este atacată de enzimă. Amiloza poate fi hidrolizată, însă, şi de β amilază, ce se găseşte în malţ şi care scindează succesiv unităţi de maltoză, începând cu capătul nereducător, cu producerea de α şi β maltoză. Amilopectina suferă şi ea acţiunea amilazelor care, însă, nu hidrolizează legăturile α (1→6) ale acesteia, produsul final al acţiunii β amilazei fiind un miez mare, foarte ramificat, numit dextrina limită. Există o enzimă de ramificare α (1→6)-glucozidaza care hidrolizează şi legăturile α (1→6) de la punctele de ramificaţie. În urma acţiunii globale a β-amilazei şi a α (1→6) glucozidazei, amilopectina se poate degrada complet la maltoză şi glucoză.

Glicogenul este forma majoră de rezervă a glucidelor din organismul animalelor şi se găseşte preponderent în ficat şi în muşchi. Are o structură foarte ramificată şi compactă, similară amilopectinei: punctele de ramificaţie mult mai numeroase sunt legate α-1,6 şi apar la fiece 8-10 reziduuri de D-glucoză legate α-1,4. Acest tip de organizare face ca glicogenul să prezinte o structură arborescentă, ramurile sale determinând creşterea solubilităţii glicogenului şi a mobilizării unităţilor sale glucidice. Acţiunea α şi β amilazei duce la formarea glucozei şi maltozei; β amilaza conduce la formarea doar a dextrinelor limită. Cu iodul, glicogenul dă o culoare roşie-violetă.

Dextranul, rezerva polizaharidică din drojdia de bere şi bacterii este format din reziduuri de glucoză unite aproape exclusiv prin puncte de ramificaţie α -1,6. Ocazional, funcţie de specie, el are puncte de ramificaţie α-1,2, α-1,3 sau α-1,4.

Celuloza, alt polizaharid major al plantelor, are mai mult un rol structural decât nutriţional şi este cel mai abundent compus organic din biosferă, cuprinzând mai mult de jumătate din tot carbonul anorganic. Este un polimer neramificat al glucozei unit prin puncte de ramificaţie β-1,4.

Configuraţia β permite celulozei să formeze lanţuri drepte foarte lungi, ceea ce este optim pentru constituirea fibrelor care au o putere extensibilă crescută. Fiecare reziduu de glucoză este legat de următorul, printr-o rotaţie de 180° şi oxigenul din inel a unuia este legat prin legătura de hidrogen a grupării 3-OH al următorului. Deşi celuloza face parte din hrana umană (vegetale, fructe), ea nu este hidrolizată sau digerată de enzimele umane.

Derivaţii glucidelor

a) **Esterii acidului fosforic ai monozaharidelor** se formează din reacţia acidului fosforic cu o grupare hidroxil a glucidului. Metabolismul glucidic (glicoliza) cuprinde diverşi intermediari care sunt glucide fosforilate (dihidroxiacetona-fosfat, gliceraldehida-3-fosfat, glucozo-6-fosfat).

De fapt, glicoliza urmăreşte formarea de intermediari cu 3 C, care să transfere grupările lor fosfat ADP-lui pentru a obţine o sinteză netă de ATP.

Fosforilarea determină glucidele să devină anioni şi în felul acesta să aibă interacţii electrostatice intense cu partea activă a unei enzime. Sarcina negativă datorată fosforilării previne de asemenea ca aceste glucide să se încrucişeze spontan cu membranele lipidice bistrat. Fosforilarea ajută la reţinerea biomoleculelor în interiorul celulei.

Fosforilarea mai are ca scop crearea intermediarilor reactivi pentru formarea O- şi N- legăturilor glicozidice. De exemplu, mulţi derivaţi fosforilaţi ai ribozei au rol important în biosinteza nucleotizilor purinici şi pirimidinici.

b) **Aminoglucidele** au gruparea hidroxil înlocuită cu o grupare amino sau aminoacetil la C anomeric al glucidului, când rezultă o legătură N-glicozidică. Legăturile N-glicozidice ale biomoleculelor ce apar natural au configuraţia β. Dintre aminoglucide, mai răspândite sunt D-glucozamina şi D-galactozamina la care gruparea hidroxil de la C 2 este înlocuită cu o grupare amino. D-glucozamina este prezentă în multe polizaharide ale ţesuturilor de vertebrate şi este componentul major al chitinei, poliglucid structural al tegumentelor exterioare ale insectelor şi crustaceelor. D-galactozamina este condroitin sulfatul,componentă a glicolipidelor şi a poliglucidului din cartilagii.

Acidul muramic şi neuraminic, elemente structurale ale polizaharidelor din peretele celular bacterian şi din învelişul celular al animalelor superioare, sunt derivaţi aminoglucidici cu 9 atomi de C (aminoglucide cu 6 atomi de C legate de un acid glucidic cu 3 atomi de C). Gruparea amino este de obicei acetilată. Acidul N-acetilmuramic este elementul major al structurii polizaharidului esenţial al peretelui celular bacterian. El face parte din structura glicoproteinelor şi glicolipidelor învelişului celular şi membranelor ţesuturilor animale. Derivatul N-acil al acidului neuraminic este acidul sialic care în ţesutul uman conţine o grupare N-acetil, în celelalte specii o grupare N-glicolil.

c) **Derivaţii acizi ai glucidelor** sunt produşi prin oxidarea C-lui aldehidic, C-lui hidroxilic sau a ambilor. Există trei tipuri de glucoacizi: aldonici, aldarici şi uronici. Acizii aldonici se obţin prin oxidarea aldozelor la C aldehidic cu ajutorul unor agenţi de oxidare slabă (D-glucoza formează acidul D-gluconic). În condiţii de oxidare energică se oxidează C grupării carbonilice şi C 2 şi se formează acizi aldarici sau zaharici (D-glucoza formează acid D-glucaric). La acizii uronici doar gruparea OH de la atomul de C primar este carboxilată (D-glucoza formează acidul D-glucuronic). Acidul glucuronic este un component al proteoglicanilor şi este implicat în metabolismul bilirubinei.

Acizii aldonici şi uronici există sub formă de lactonă. Unul din cei mai importanţi gluco-acizi este acidul ascorbic (vitamina C), lactona acidului hexonic cu structura endiolică la C 2 şi C 3, a cărui lipsă îndelungată din dietă duce la scorbut şi care se găseşte în cantitate mare în citrice şi tomate.

Dezoxiglucidele posedă un H în locul uneia dintre grupele hidroxil. Cea mai răspândită dintre acestea este 2-dezoxi-D-riboza, componentul glucidic al DNA. L-Ramnoza (6-dezoxi-L-manoza) şi L-fucoza (6-dezoxi-L-galactoza) sunt componente principale ale peretelui celular bacterian.

d) **Alcoolii polihidroxilici (poliolii) derivaţi din glucide.** Monozaharidele se pot reduce la C carbonilic de către H în prezenţa catalizatorilor metalici sau a amalgamului de sodiu, ducând la formarea polihidroxialcoolilor corespunzători. Aldozele dau naştere la poliolii corespunzători, respectiv D glucoza la D sorbitol, D manoza la D manitol, D galactoza la dulcitol. Cetozele formează 2 alcooli datorită unui nou C asimetric ce apare (ex. D fructoza formează D manitol şi D sorbitol).

Polialcoolii derivaţi din glucide constituie în principal intermediari ai căilor metabolice minore.

e) **Glicoproteinele** sunt compuşi ce conţin resturi de glucide legate covalent de lanţul polipeptidic şi au o largă distribuţie şi semnificaţie biologică (vezi 5.4.4).

3.4.2. Funcţiile biologice

Glucidele (hidraţii de carbon) au un domeniu larg de structuri şi funcţii. Ele pot fi cetone polihidroxilate, aldehide polihidroxilate sau compuşi ce pot fi hidrolizaţi cu obţinerea acestora. Funcţiile mai importante ale glucidelor se pot grupa după cum urmează:

1. Glucidele (simple sau complexe ce se scindează în simple) furnizează majoritatea energiei în cele mai multe organisme. Astfel, amidonul este substanţa nutritivă majoră derivată din celulele plantelor ingerate. Lactoza, un dizaharid al glucozei şi galactozei, este componentul major glucidic al laptelui. Fructoza, izomerul cetozic al glucozei este ingerat ca atare în fructe şi este de asemenea o sursă glucidică dacă se utilizează sub formă de sucroză (dizaharid compus din glucoză-fructoză). Glucoza, produsul digestiei

amidonului, este forma predominantă în care glucidul se prezintă în celulele corpului.

Glicogenul, forma majoră a depozitării glucidice la animale, prin natura sa polimerică permite sechestrarea energiei fără problemele efectelor osmotice pe care le-ar cauza glucoza.

Amidonul în plante şi glicogenul la animale sunt polizaharide ce pot fi rapid mobilizate să producă glucoză, un prim combustibil pentru generare de energie.

Şi ATP-ul, derivat fosforilat glucidic, este o substanţă universală producătoare de energie liberă. Glicoliza fie aerobică, fie anaerobică, conduce la formarea netă de ATP. Această substanţă ia naştere în diferite etape ale glicolizei, dar se şi consumă în altele.

2. Glucidele formează elemente de structură a pereţilor şi învelişurilor celulare ale spaţiului intracelular şi ale ţesutului conjunctiv determinându-le atât forma, elasticitatea sau rigiditatea în cazul ţesuturilor animale şi vegetale, cât şi protecţia şi suportul organismelor unicelulare. Polizaharidele constituie şi componentele majore ale scheletului exterior ce aparţine unor nevertebrate.

Suprafaţa celulară animală este implicată în multe tipuri de reacţii intercelulare. Printre componenţii majori ai învelişului celular existent în organismele superioare se includ glicoproteinele şi un grup de substanţe înrudite cu heteropolizaharidele, numite mucopoliglucide acide.

3. Glucidele servesc ca intermediari metabolici (glucozo-6-fosfat, fructozo-1,6 bifosfat). Sursele de compuşi organici şi de energie ale glicolizei sunt amidonul rezultat din ingerarea plantelor, lactoza, glucidul major al laptelui şi fructoza ingerată prin fructe şi rezultată prin desfacerea sucrozei. Glucoza, produsul digestiei amidonului, este forma majoră în care glucidul se prezintă în celulele organismului. Glicogenul este forma preponderentă de rezervă a glucidelor animale. Prin digestia glucidelor cu enzimele tractului digestiv se ajunge la D-glucoză, D-galactoză şi D-fructoză, toate fiind monozaharide.

4. Glucidele (riboza, dezoxiriboza) formează parte din conţinutul structural al acidului dezoxiribonucleic (DNA) şi al acidului ribonucleic (RNA). În cele mai multe organisme, DNA constituie materialul genetic. RNA serveşte ca material genetic pentru unele virusuri, transportă informaţia genetică la locul sintezei proteinei, formează legătura crucială între RNA mesager şi aminoacizi, fiind cuplat în sinteza proteinelor şi este un component esenţial al ribozomilor şi al unor enzime. De fapt, RNA poate avea activitate catalitică fără a interacţiona cu proteine.

5. Glucidele joacă rol în lubrefierea, intercomunicarea celulară şi imunitate. Faptul că unităţile glucidice ale glicoproteinelor sunt atât de diverse şi complexe sugerează că ele sunt bogate în informaţii şi importante funcţional. Faţă de celuloză şi amidon, unde unităţile de bază sunt formate din glucoză şi aproape toate unite prin acelaşi tip de înlănţuire glicozidică, glicoproteinele conţin 5 tipuri de reziduuri unite prin diverse modalităţi de astfel de înlănţuiri.

Multe glicoproteine nou-sintetizate, ca imunoglobulinele sau hormonii peptidici, conţin unităţi glucidice cu reziduuri terminale reprezentate de acidul sialic. După un timp (ore, zile), funcţie de specificitatea proteinei, reziduurile terminale de acid sialic se îndepărtează cu sialilaza, prin proteinele receptoare de suprafaţă de pe celulele hepatice. Viteza de îndepărtare a acidului sialic din glicoproteine este controlată de structura proteinei însăşi.

Glucidele sunt, de asemenea, implicate în medierea adeziunii celulă-celulă, în timpul evoluţiei animalelor. Adeziunea neuronilor în dezvoltarea sistemului nervos este mediată parţial de o moleculă numită N-CAM (*Neural Cell Adhesion*) care se leagă de corespondenta sa de la alt neuron în stabilirea unei legături permanente între ei. Studii asupra agregării celulelor retinale arată că în acest proces participă o celulă proteoglican-heparan sulfat şi adeziunea depinde de legătura N-CAM heparan sulfat cât şi de o moleculă N-CAM a celulei opuse.

Unităţile glucidice de pe pereţii şi învelişurile celulare, deci, nu au rol numai în menţinerea structurii ţesuturilor, ci sunt participanţi cheie, conţinând situsuri specifice de recunoaştere celulă-celulă, importante în morfogeneza ţesuturilor şi organelor. Ele mai conţin şi anticorpii de pe suprafaţa celulei din ţesuturile nevertebratelor.

3.4.3. Metodele de identificare și dozare

Glucoza se găseşte sub trei forme în soluţie (piranozică, aldehidică şi enediol), funcţie de pH-ul soluţiei şi solvent. Cea aldehidică este foarte instabilă şi se găseşte în soluţie apoasă, iar cea enediolică este favorizată de pH-ul alcalin şi este forma ce îi furnizează glucozei proprietăţile reducătoare. În soluţie neutră sau slab acidă predomină forma piranozică.

Glucoza în serul sau plasma umană se află într-o concentraţie cuprinsă între 70 şi 105 mg/100 ml; în sângele total este ceva mai scăzută, între 65 şi 95 mg/100 ml. Concentraţia glucozei în sângele arterial şi capilar „a jeune" este aprox. cu 5 mg/100 ml mai mare decât a glucozei din sângele venos. În lichidul cefalorahidian, concentraţia glucozei este aproximativ 60-70% din nivelul său plasmatic şi este cuprinsă între 40 şi 70 mg/100 ml.

Determinarea glucozei sanguine este o cerinţă primară a investigării metabolismului glucidic. Pentru evaluarea acestei surse imediate de energie se utilizează următoarele tipuri de metode:

a) Determinarea enzimatică a glucozei sanguine, metodă ce evaluează exclusiv această substanţă şi de aceea preferată faţă de oricare alta, datorită sensibilităţii şi specificităţii sale.

Prezenţa, însă, a inhibitorilor poate descreşte acurateţea rezultatelor.

Glucoxidaza oxidează β-D-glucoza la δ gluconolactonă, care final trece în acid D-gluconic. Completa oxidare a glucozei cu această enzimă necesită ca toată glucoza să se convertească în forma β. Viteza mutarotaţiei este

afectată de pH, temperatură şi de mutarotază. Folosindu-se metoda fotometrică directă, s-a cuplat un sistem enzimatic în care perhidrolul (H_2O_2) format, se combină, via peroxidază, cu un acceptor (indofenol, dietil-p-fenilendiamină, adrenalină). Perhidrolul format reacţionează mai departe cu 4-amino antipirină şi cu acidul 4-hidroxi benzoic în prezenţa peroxidazei pentru a forma N-(4-antipiril)-p-benzoquinon imina. Mutarotaza accelerează reacţia. Cantitatea de colorant format este proporţională cu concentraţia de glucoză.

Glucozodehidrogenaza catalizează oxidarea glucozei în prezenţa NAD cu obţinerea D-gluconolactonei. Adiţia mutarotazei accelerează cursul acestei reacţii. Cantitatea de NADH formată este proporţională cu concentraţia glucozei.

b) Determinarea glucozei pe baza reacţiei sale cu diverse amine aromatice (printre care şi o-toluidina) în soluţie de acid acetic fierbinte produce derivaţi coloraţi. O-toluidina se condensează iniţial cu gruparea aldehidică a glucozei pentru a forma un amestec de glicozilamină şi bază Schiff corespunzătoare, amestec care se află în echilibru.

Metoda cu o-toluidină se foloseşte frecvent pentru înalta sa specificitate, simplitate şi folosire a serului nedeproteinizat. Deoarece reacţia nu se bazează pe proprietăţile reducătoare ale glucozei, numai câţiva compuşi reacţionează cu o-toluidina, pentru a produce substanţe care să absoarbă la o lungime de undă ce măsoară compusul colorat format cu glucoză.

c) Determinarea substanţelor reducătoare ce evaluează nu numai glucoza, ci toate glucidele reducătoare, şi pe lângă acestea alte substanţe (ureea, creatinina, acidul ascorbic, glutationul) face ca aceste procedee să fie cu specificitate redusă şi să nu se mai folosească. Acest tip de metode implică ca forma enediol foarte reactivă să se oxideze uşor, lanţul de carboni să se rupă cu obţinerea de acizi cu lanţuri mai scurte. Oxidarea depinde de pH, temperatură, concentraţie de sare şi de concentraţia oxidantului. În această categorie se includ metodele ce cuprind fericianura ca oxidant în soluţie alcalină, ce se reduce la ferocianură şi se măsoară prin formarea ferocianurei ferice, a ferocianurei de molibden sau a ferocianurei de uranil. De asemenea, se mai foloseşte măsurarea culorii produse de fosfomolibdat redus cu oxidul cupros şi formarea albastrului de molibden, de fosfotungstat, arsenomolibdat sau neocuproin.

d) Separarea prin cromatografie de afinitate şi măsurarea fotometrică a Hb glicozilate faţă de cea neglicozilată. HbA_1 reacţionează spontan cu glucoza pentru a forma un derivat HbA_{1c}. Reacţia implică formarea neenzimatică a unei baze Schiff între glucoză şi gruparea amino a aminoacidului terminal al lanţului β. Baza Schiff labilă devine mai stabilă ca aminocetonă. Obişnuit, concentraţia HbA_{1c} din sânge este foarte scăzută, dar în diabet, unde nivelul de glucide din sânge este crescut, HbA_{1c} poate atinge 12% din Hb totală. Datorită faptului că media de viaţă a hematiilor este de 120 de zile, evaluarea HbA_{1c} constituie un indicator fidel al nivelelor de glucoză sanguină.

Metoda se realizează pe o coloană de agaroză ce are legat covalent acidul aminofenilboronic. Ligantul formează un complex de formă ceto a Hb glicozilate, fracţie reţinută pe coloană. Hb neglicozilată trece prin coloană. Se colectează ambele fracţiuni, Hb glicozilată separându-se de acidul fenil boronic cu sorbitol, conţinând tampon de eluţie. Măsurând absorbţia ambelor fracţiuni se poate calcula conţinutul procentual al Hb glicozilate.

3.5. Lipidele

Lipidele sunt substanţe organice compuse primar din C, H, în mică măsură O, uneori N şi P, care conţin fragmente de hidrocarburi, grupări hidroxil şi ester. Datorită predominanţei în structura lor a lanţurilor de hidrocarburi (CH_2-CH_2-CH_2-), ele prezintă caractere hidrofobe care explică completa sau parţiala insolubilitate în apă şi solubilitate în solvenţi organici ca hidrocarburi (eter de petrol şi benzen), hidrocarburi halogenate (cloroform, tetraclorură de carbon, dicloretan) şi eter. Unele lipide complexe conţin glucide, anume, radicali fosforici sau alte forme structurale care tind să confere solubilitatea acestor compuşi în solvenţi polari ca alcoolul sau apa. În lichidele fiziologice şi în ţesuturi, cele mai multe molecule de lipide sunt prezente în combinaţii cu proteine, aşa-numitele complexe lipido-proteice, lipoproteine ce accelerează solubilitatea lipidelor în mediu apos.

Clasificarea lipidelor s-a făcut după multe criterii. Cel mai uzitat împarte lipidele în două mari clase:

– lipide complexe ce au prezente în structura lor acizii graşi, numite şi saponificabile deoarece prin hidroliză alcalină eliberează săruri ale acizilor graşi;

– lipide simple, nesaponificabile, ce nu conţin în structura lor acizi graşi.

În cadrul lipidelor saponificabile intră gliceridele, fosfogliceridele, corpii cetonici, sfingolipidele şi cerurile. Cele nesaponificabile cuprind terpenele, steroizii şi ecosanoizii.

ACIZII GRAŞI, componente caracteristice ale tuturor lipidelor complexe ce conţin catene hidrocarbonate, sunt insolubili în apă, cu lanţ lung şi cu o grupare carboxil la capătul lanţului, şi pot fi saturaţi sau nesaturaţi. Principalii acizi graşi ce se găsesc în ţesuturile mamiferelor sunt: acidul lauric, acidul miristic, acidul palmitic, acidul oleic, acidul linoleic, acidul linolenic, acidul arahidonic.

Acizii graşi saturaţi nu au dublă legătură în lanţ, catena atomilor de carbon este flexibilă şi poate exista în mai multe conformaţii, căci fiecare legătură simplă din catenă are o libertate completă de rotaţie. Denumirea lor ştiinţifică cuprinde numărul de carboni cu sufixul "anoic". Formula lor

generală este CH_3-$(CH_2)_n$-COOH unde „n" este numărul grupărilor metilen cuprinse între carbonii metil şi carboxil.

Acizii graşi nesaturaţi au cel puţin o dublă legătură. Denumirea ştiinţifică include numărul atomilor de carbon, numărul dublelor legături şi sufixul "enoic".

Dubla legătură ce se realizează între doi carboni adiacenţi fixează întrucâtva poziţiile acestor doi atomi în spaţiu, care în alternativa de simplă legătură se pot roti liber. Deci acizii graşi nesaturaţi au în structura lor unul sau mai multe puncte rigide datorită dublelor legături lipsite de libertate de rotaţie. Aceasta are repercusiuni asupra legăturilor rămase libere, ale fiecărui carbon, în sensul că ele trebuie să se orienteze specific. Când în structura acidului gras nesaturat este mai mult decât o dublă legătură, ele se separă obişnuit prin intervale de trei atomi de carbon.

Acizii graşi apar în natură sub forma „cis", adică perechea de atomi de hidrogen de pe atomii de carbon participanţi se află pe aceeaşi parte a dublei legături; forma trans se aseamănă cu forma extinsă a lanţului saturat. Formele cis ale acizilor graşi nesaturaţi pot trece în forme trans prin încălzire, în prezenţă de catalizatori.

Acizii graşi nesaturaţi dau reacţii de adiţie la legăturile duble, acesta fiind un indiciu al dublelor legături.

Acizii graşi neesenţiali se pot sintetiza prin oxidarea glucozei. Ei se numesc astfel deoarece nu se introduc obligatoriu în dietă.

Acizii graşi esenţiali trebuie obţinuţi din dietă, adică sunt necesari în alimentaţie. În această categorie intră acidul linoleic şi linolenic.

Acizii graşi au caracteristici asemănătoare detergenţilor datorită naturii lor amfipatice, adică a capetelor lor nepolare (-CH_3) şi polare (-COOH). În sistemele bifazice ei se orientează cu capătul polar asociindu-se cu apa şi cu cel nepolar cu faza hidrofobică. Punctul lor de topire este dependent de lungimea lanţului şi de gradul de nesaturare.

3.5.1. Lipidele complexe şi lipidele simple

A. Lipidele complexe (saponificabile)

TRIGLICERIDELE (triacilglicerolii) sunt componentele principale ale grăsimilor de rezervă şi ale grăsimilor din lapte. Ele se găsesc în proporţii variabile şi în lipoproteinele plasmatice. După ingerarea de grăsimi, trigliceridele se localizează şi în mucoasa intestinală ca urmare a absorbţiei acizilor graşi de către celulele acestei mucoase. Totuşi, imediat după formare, aceste trigliceride sunt eliberate din celulele mucoase în limfa intestinală.

Trigliceridele – după cum le spune şi numele – sunt triesteri ai glicerolului cu trei acizi graşi. Compuşii cu un singur tip de acid gras în toate cele trei poziţii – triacil glicerolii simpli – se denumesc după acidul gras care îl conţin.

Denumirea curentă este, însă, tristearină, tripalmitină etc. Triacilglicerolii micşti conţin doi sau mai mulţi acizi graşi diferiţi. Grăsimile naturale sunt, de obicei, amestecuri extrem de complexe de triacilgliceroli simpli şi micşti.

Punctul de topire al trigliceridelor depinde de numărul şi lungimea acizilor graşi saturaţi din compoziţia lor. Ele sunt insolubile în apă, solubile în solvenţi organici; densitatea lor este mai mică ca a apei. Fierte cu acizi sau baze, sau atacate de lipaze se hidrolizează. Hidroliza cu alcalii, numită saponificare, duce la un amestec de săpunuri şi glicerol.

Lipidele cu conţinut de fosfor având denumirea mai veche de FOSFOLIPIDE includ două clase de substanţe, anume fosfogliceride şi sfingolipide. Ele constituie elementul major al membranelor celulare, apar în concentraţii crescute în lipidele organelor glandulare, plasmă sanguină, gălbenuş de ou şi în seminţele legumelor. 40% din lipidele membranei eritrocitare şi peste 95% din lipidele membranei mitocondriale interioare sunt fosfolipide. Fosfolipidele se găsesc în unele lipoproteine.

FOSFOGLICERIDELE – lipide cu fosfor şi drept component principal glicerolul – sunt triesteri ai 3 – glicerol fosfatului.

Cum multe din lipidele naturale sunt gliceril esteri ai acizilor graşi, rezultă că molecula de glicerol prezintă caracteristici deosebite. Cei doi carboni terminali (primari) ai moleculei de glicerol sunt echivalenţi chimic. Dacă unul dintre ei devine parte a unei grupări ester sau a altei grupări funcţionale (grupările hidroxil rămânând intacte), molecula de glicerol devine asimetrică, carbonul dintre cei doi terminali constituind centrul asimetriei.

Fosfogliceridele se pot considera ca derivând de la acidul fosfatidic care trece într-un glicerofosfatid prin adiţionarea unui alcool, hidroxilul unui aminoacid sau o grupare fosfat dintr-o moleculă de acid fosfatidic. Fosfogliceridele includ următorii compuşi:

– fosfatidil colina (lecitina sau colinfosfoglicerida) care conţine un aminoalcool, colina;

– fosfatidil etanolamina (cefalina sau etanolamina fosfoglicerida) având ca aminoalcool, etanolamina;

– fosfatidil serina (cefalina) în care acidul fosforic este esterificat cu gruparea oxidril a aminoacidului L-serină;

– fosfatidil inozitolul cu alcoolul ciclic cu 6 atomi de carbon – inozitolul;

– cardiolipina (difosfatidil glicerolul) cu o grupare fosfat dintr-o moleculă de acid fosfatidic.

Plasmalogenele sunt fosfolipide mai abundente în muşchi şi nervi. În structura lor gruparea alcoolică din glicerol este legată eteric de un enol alifatic superior; alcoolul azotat care esterifică gruparea fosforil este de obicei etanolamina.

Fosfatidil-glicerolii sunt fosfatide ce nu au azot. Ele cuprind una sau două resturi fosfatidil legate de glicerol. Difosfatidil-glicerolul (cardiolipina) este componenta principală fosfolipidică a membranei interne mitocondriale. Fosfatidil glicerolul intră în compoziţia surfactantului pulmonar.

Fosfogliceridele sunt cele mai polare lipide, deoarece au un capăt polar legat de cozile alifatice nepolare. Ele prezintă din această cauză o natură amfipatică, posedând atât grupări hidrofilice şi hidrofobice, cât şi regiuni de tranziţie între fazele apoase şi neapoase. Fosfogliceridele sunt de asemenea amfotere, prezentând grupări încărcate negativ şi pozitiv.

La caracterul amfipatic al lecitinelor se alătură şi proprietăţi puternic tensioactive. Ele se dizolvă în apă formând agregate, micelii, alcătuite din două straturi lipidice stabilizate prin forţele van der Waals dintre catenele hidrocarbonate ale resturilor acil, aşezate paralel şi prin interacţiile electrostatice dintre grupările polare. Apa eliberată dintre resturile acil hidrofobe măreşte stabilitatea bistratului lipidic. Formarea spontană a lipidelor amfipatice ca bistraturi stă la baza membranelor biologice cu o structură dublă lipidică.

Fosfogliceridele pure sunt substanţe solide, albe, ceroase. În contact cu aerul devin brune şi suferă modificări chimice datorită tendinţei acizilor graşi polinesaturaţi din compoziţia lor de a se oxida cu oxigenul din aer, polimerizându-se. Ele sunt solubile în majoritatea solvenţilor nepolari ce conţin puţină apă.

Hidrolizate blând cu alcalii eliberează acizii graşi sub formă de săpunuri, porţiunea glicerol- acid fosforic-alcool rămânând intactă. Fosfolipidele specifice hidrolizează de asemenea fosfogliceridele. Îndepărtarea unui acid gras dintr-o fosfogliceridă duce la formarea lizofosfogliceridelor, produşi intermediari ai metabolismului fosfogliceridelor. Acestea se află în celule şi ţesuturi în cantităţi foarte mici; în cantităţi mari ele sunt toxice pentru membrane.

CORPII CETONICI sunt substratele de energie preferate ale inimii, muşchiului scheletic şi ale rinichiului. În această categorie se încadrează acetoacetatul, β hidroxibutiratul şi acetona.

Corpii cetonici sunt sintetizaţi în mitocondriile celulei hepatice şi sunt folosiţi drept sursă de energie metabolică de către alte ţesuturi. Ficatul nu poate să-i utilizeze în acest scop. Sinteza este limitată, cu excepţia condiţiilor de viteze mari de oxidare ale acizilor graşi şi la ingerarea limitată a glucidelor; în inaniţie apare o producţie considerabilă. În condiţiile de inaniţie, corpii cetonici sunt unica sursă de energie, aşa încât ei sunt consumaţi de către organism şi nu există şansa unei acumulări. Cetonemia şi cetonuria nu sunt niciodată suficiente pentru a determina cetoacidoză (cetoză însoţită de acidoză metabolică) ce ar apărea ca urmare a inundării sistemelor tamponate sanguine de către nivelele crescute ale corpilor cetonici acizi. În diabetul netratat, nivelul sanguin de corpi cetonici poate fi ridicat şi în felul acesta capabil de a preveni cetoacidoza.

SFINGOLIPIDELE, lipide ce conţin fosfor şi drept component principal sfingozina, sunt prezente în aproape toate ţesuturile umane, cu precădere în sistemul central nervos. În această categorie se includ sfingomielinele şi glicosfingolipidele, ele fiind derivate ale sfingozinei.

Sfingomielinele, componenţii majori fosfolipidici ai membranelor, ţesuturilor neurale, se formează din ceramidă (acid gras + sfingozină) şi citidin difosfat-colină.

Glicosfingolipidele sunt sfingolipide ce conţin glucide şi sunt grupate în 4 clase: cerebrozide, sulfatide, globozide şi gangliozide.

Cerebrozidele se găsesc în membranele ţesutului neural şi sunt ceramide monohexozide, cele mai importante fiind gluco- şi galactocerebrozidele.

Sulfatidele includ un sulfolipid major din creier, anume β-sulfogalactocerebrozidul.

Globozidele sunt ceramide oligozaharide care conţin două sau mai multe molecule de glucide, cel mai des galactoză, glucoză sau N-acetilgalactozamină ataşate de ceramidă. Ele se întâlnesc în ser, splină, ficat şi eritrocite.

Gangliozidele sunt glicosfingolipide ce conţin una sau mai multe reziduuri de acid neuraminic, de obicei ca derivat N-acetil, care este acidul sialic. Ele se găsesc în concentraţii mari în special în celulele ganglionare ale sistemului nervos central şi în concentraţii mai reduse în membranele celor mai multe celule.

CERURILE sunt esteri solizi ai acizilor graşi superiori cu alcooli graşi monohidroxilici cu lanţ lung sau cu steroli. La cald se înmoaie şi se pliază, la rece devin rigide. Se găsesc în învelişurile de protecţie ale pielii, blănii, penelor, pe frunzele şi fructele plantelor superioare şi pe scheletul exterior al multor insecte.

B. Lipidele simple (nesaponificabile).

Compuşii ce fac parte din această clasă nu sunt scindaţi prin hidroliză, nu conţin acizi graşi şi, deşi se găsesc în cantităţi mai mici faţă de lipidele complexe, cuprind substanţe de mare importanţă. În această categorie intră două tipuri de substanţe (terpene şi steroizi) având structură poliizoprenică.

TERPENELE sunt compuşi foarte răspândiţi în regnul vegetal, mai puţin în cel animal. Multe dintre terpenele identificate în plante au mirosuri sau arome caracteristice şi sunt componente majore ale uleiurilor de muşcată, lămâie, mentă, terebentină, camfor; dintre diterpene, fitolul este componentul clorofilei; dintre triterpene, squalenul, precursor al colesterolului.

Terpenele superioare cuprind *carotenoizii*, o clasă de hidrocarburi tetraterpenice şi derivaţii oxigenaţi ai acestora. Un carotenoid important este β carotenul, precursor al vitaminei A. Unele dintre cele mai importante terpene sunt trei dintre vitaminele liposolubile, anume A, E, K.

O altă clasă de terpene cuprinde *poliprenolii*, compuşi poliizoprenici lineari cu lanţ lung şi gruparea terminală de alcool primar.

Terpenoizii au rol de coenzime şi în clasa ce include derivaţii *ubichinonei* (coenzima Q) ce funcţionează ca transportori de hidrogen în oxidările biologice din mitocondrii.

STEROIZII sunt lipide ce conţin trei inele ciclohexanice şi unul ciclopentanic condensate, ce constituie nucleul steroidic.

Sterolii sunt alcooli steroidici ce conţin o grupare hidroxil şi un lanţ alifatic de cel puţin 8C.

Lanosterolul este precursorul **colesterolului** – sterolul major al corpului uman, componentul structural al membranelor celulare şi al lipoproteinelor plasmatice. El este, la rândul său, precursorul multor steroizi din ţesuturile animale, ca hormonii steroizi şi acizii biliari. Fiind un alcool, colesterolul se poate esterifica cu acizii graşi. Aproximativ 2/3 din colesterolul plasmatic se prezintă sub această formă. Enzima implicată în acest proces este o transferază care transferă acizii graşi din fosfatidil colină, funcţiei alcool a sterolului. Deoarece reacţia enzimatică continuă şi la rece, după ce se recoltează sângele, raportul colesterol liber/colesterol esterificat modificându-se în timp, se indică efectuarea analizelor imediat după recoltare. Cu excepţia bolilor hepatice severe, raportul colesterol esterificat faţă de colesterolul total este aproape constant.

Hormonii steroizi produşi la om sunt formaţi şi secretaţi de către cortexul adrenalinic, testicule, ovare şi placentă. Compusul steroidic înrudit cu vitamina D3, un precursor al colesterolului, se formează în rinichi.

Cortexul adrenalinic produce hormoni cu activităţi fiziologice diferite. *Cortizolul*, care se produce primar la om, reglează un număr de trepte metabolice cheie şi inhibă totodată răspunsul inflamator. Acesta este numit glucocorticoid, fiind un derivat 11-ceto cortizon, steroid echivalent clinic. Zona glomeruloasă adrenalinică produce *aldosteronă* ce controlează reabsorbţia Na^+ în rinichi şi este numită corticoid mineral.

Steroizii gonadali includ *testosterona* produsă de celulele Leydig ale testiculelor, hormon responsabil pentru dezvoltarea caracteristicilor sexuale secundare ale bărbatului. De asemenea, ei mai cuprind *estradiolul* şi *progesterona* produse de ovare. Progesterona se mai formează şi din placentă în timpul sarcinii.

Acizii biliari, substanţe analoage detergenţilor, joacă un rol important în emulsionarea şi absorbţia lipidelor în intestin. Ei se formează din colesterol şi sinteza şi eliminarea lor prin scaun reprezintă o cale de excreţie a acestuia. În acest fel, prin continua conversie a colesterolului în acizi biliari, se previne acumularea excesivă a colesterolului în ţesuturi. Acizii biliari ce predomină în bila umană sunt acizii colic, chenodezoxicolic, dezoxicolic şi litocolic.

Acizii biliari sunt steroizi cu 24 atomi de carbon. Acizii colic şi chenodezoxicolic se formează în ficat din colesterol şi sunt cunoscuţi ca acizi biliari primari. Acizii dezoxicolic şi litocolic sunt cunoscuţi ca acizi biliari secundari, căci se formează din cei primari în intestin, prin acţiunea enzimelor bacteriale intestinale.

Ph-ul alcalin al bilei determină existenţa acizilor biliari sub formă de săruri biliare. În ficat, acizii biliari se pot conjuga cu glicina sau taurina pentru a forma glico- sau taurocolaţii. Aceştia se găsesc în bilă de asemenea sub formă de săruri.

Acizii biliari liberi sau conjugaţi prezintă o solubilitate aparte. Ei posedă grupări care conferă moleculelor caracter hidrofil şi hidrofob. Sărurile biliare se dizolvă în apă formând soluţii micelare şi cu alte lipide se constituie în agregate micelare mixte, care au capacitatea de a solubiliza lipide mai polare sau mai puţin polare.

ECOSANOIZII sunt produşii metabolismului acidului gras polinesaturat cu 20 C, acidul arahidonic. Din această clasă fac parte prostaglandinele, tromboxanii, acizii hidroperoxiecosatetraenoici şi leucotrienele.

Prostaglandinele sunt analoagele acidului prostanoic ce nu există în natură, dar este referinţă pentru nomenclatură. Cele mai cunoscute prostaglandine sunt E_1, $F_1\alpha$ şi $F_2\alpha$, ce modulează multe activităţi biologice ca relaxarea şi contractarea muşchilor netezi, secreţia gastrică, agregarea plachetară, răspunsul inflamator, răspunsul hormonilor trofici, retenţia sodiului şi a apei prin tubulii renali.

Tromboxanii sunt derivaţi analogi acidului prostanoic, dar posedă un inel hexagonal ce conţine oxigen. Tromboxanul A_2 este produs de trombocite, cauzează contracţia arterelor şi împiedică agregarea trombocitelor. Prostaciclina (PGI_2) are efect contrar şi este produsă de celulele endoteliale ale sistemului vascular.

Acizii hidroperoxiecosatetraenoici (HPETE) sunt derivaţii hidroxi de acid gras ai acidului arahidonic, ce nu conţin o structură inelară.

Leucotrienele se formează din acizii hidroperoxiecosatetraenoici prin hipoxigenare. Leucotrienele sunt implicate în chemotaxie, inflamaţii şi în reacţii alergice. Leucotriena D_4 s-a identificat ca substanţă ce reacţionează slab în anafilaxie, cauzează contracţia muşchiului neted şi este de 1000 ori mai potentă ca histamina în constricţia căilor respiratorii. Ea creşte scurgerea fluidului din vasele mici de sânge şi produce constricţia arterelor pulmonare. Leucotrienele B_4 atrag neutrofilele şi eozinofilele ce se găsesc în număr mare în zonele cu inflamaţie.

3.5.2. Proprietăţi

Lipidele prezintă o serie de proprietăţi chimice caracteristice.

HIDROLIZA ENZIMATICĂ are loc sub acţiunea lipazelor a căror specificitate este uneori utilă analizei componenţilor lipidelor complexe.

Saponificarea constă din acţiunea alcaliilor asupra grăsimilor cu producere de glicerol şi săruri alcaline ale acizilor graşi numite săpunuri. Acestea prezintă o serie de proprietăţi, ca acţiune emulsionantă, germicide selective şi activitate de detoxifiere.

Formarea de membrane, micelii, emulsii se datorează faptului că unele lipide sunt parţial solubile în solvenţi nepolari, deoarece conţin predominant grupări nepolare (hidrocarbonate), alături de grupări polare ce permit solubilitatea parţială în solvenţi polari. Moleculele se orientează astfel la interfaţa celor două tipuri de solvenţi, cu gruparea polară în faza apoasă şi cea nepolară în faza nepolară. Un astfel de strat dublu de lipide constituie

structura de bază a membranelor biologice. Când lipidele polare din mediul apos ating concentraţia critică, ele formează micelii. Agregarea sărurilor biliare în micelii şi formarea de micelii mixte cu produşii digestiei grăsimilor uşurează absorbţia lipidelor din intestin. Emulsiile sunt particule mult mai mari, formate uzual din lipide nepolare în mediu apos. Ele sunt stabilizate de către agenţi emulsificatori ca lipidele polare, ce formează un strat de suprafaţă ce separă substanţa preponderentă nepolară de faza apoasă.

3.5.3. Funcţiile biologice

Lipidele prezintă o serie de funcţii biologice importante şi anume, ele au rolul de a fi:

– componente structurale ale membranelor;

– forme de depozitare a combustibilului metabolic;

– forme de transport al combustibilului metabolic;

– parte din învelişul exterior al organismului şi al mediului înconjurător, realizând protecţia faţă de bacterii, plante, insecte şi vertebrate;

– componente ale suprafeţei celulare implicate în recunoaşterea celulară, în specificitatea de specie şi în imunitatea tisulară.

Acizii graşi esenţiali sunt precursori ai biosintezei unor derivaţi, prostaglandinele, care sunt compuşi de tip hormonal, cu efecte profunde asupra unor activităţi fiziologice.

Acizii graşi sunt transformaţi în trigliceride pentru transportul dintre ţesuturi şi pentru depozitarea combustibilului metabolic. Rezervele principale ale combustibilului metabolic la om sunt depozitate ca grăsime în celulele grase (adipocite). Dintre grăsimile ingerate, o proporţie preponderentă o au trigliceridele care constituie combustibilul metabolic necesar pe termen lung. Ele prezintă o formă concentrată de combustibil, realizând prin arderea lor completă mai mult decât dublu de kcal/g faţă de glucide. Fiind insolubile în apă, ele nu prezintă probleme osmotice în celulă, chiar când se depozitează în cantităţi mari.

Apariţia acizilor graşi în sânge în timpul mesei se datorează mobilizării rezervelor de grăsime prin procesul de lipoliză. Acizii graşi sunt utilizaţi de cele mai multe ţesuturi, cu excepţia creierului, ca un combustibil metabolic pentru producerea energiei, sau ca o sursă de carbon pentru biosinteza lipidelor. Glicerolul ce nu poate fi utilizat de către celulele ţesutului adipos este cules de către ficat ca un substrat pentru gluconeogeneză.

Glicosfingolipidele, constituente minore ale membranei, au rol important privind unele funcţii speciale. Cum gangliozidele se găsesc în special în terminaţiile nervoase, s-a emis ipoteza rolului lor în transmisia impulsului nervos prin sinapse. Se presupune că ele ar fi prezente în unele substanţe neurotransmiţătoare. O parte din glicosfingolipidele de pe suprafaţa celulară sunt legate nu numai de specificitatea de grup sanguin, dar şi de specificitatea

de organ sau ţesut. Aceste lipide au rol în imunitatea tisulară şi în zonele de recunoaştere celulă-celulă.

Prostaglandinele care se găsesc în diferite ţesuturi, la concentraţii foarte joase, coordonează o serie de activităţi biologice, cum ar fi contractarea şi relaxarea muşchilor netezi, secreţia gastrică, agregarea plachetară, răspunsul inflamator, răspunsul la hormoni trofici, retenţia sodiului şi a apei de către tubulii renali.

Tromboxanul A_2 (TXA_2) produs de trombocite, cauzează contracţia arterelor şi opreşte agregarea plachetară.

Leucotrienele joacă rol în chemotaxie, în reacţiile inflamatorii şi alergice.

Excesiva acumulare a colesterolului în ţesuturi este prevenită de trecerea continuă a colesterolului în acizi biliari, compuşi ce se excretă în scaun.

Membranele – entităţi care caracterizează structura celulară – în afară de faptul că separă evenimentele intracelulare, celulele una de alta şi funcţiile organului, mediază funcţiile celulare acţionând ca nişte bariere selective şi localizează sistemele enzimatice specifice. Ele sunt formate din proteine, lipide şi glucide ce sunt ataşate membranei proteinice sau lipidice. Proporţia proteine/lipide este variabilă. Fosfolipidele, glicolipidele şi colesterolul sunt lipidele majore ale membranelor. Ele sunt molecule amfipatice, având capete hidrofobice şi hidrofilice.

Lipidele din membrană formează spontan bistraturi în medii apoase, izolând zonele hidrofobice şi expunând capetele hidrofilice spre apă. Ele se supun unei difuzii laterale sau unei mişcări de translaţie foarte rapide şi unei mişcări de flexiune maximă la capătul hidrofobic ce se opune capătului polar. Colesterolul descreşte abilitatea fosfolipidelor de a se supune acestor tipuri de mişcări. Fosfolipidele sunt asimetric distribuite în membranele plasmatice. Colinfosfolipidele constituie faţa exterioară a bistratului, amino fosfolipidele pe cea interioară. Glicolipidele se găsesc în faţa exterioară a bistratului cu reziduurile lor glucidice expuse la suprafaţa celulei. Se pare că un rol în interacţiile celulă-celulă îl joacă complexul oligozaharidic.

3.5.4. Metodele de analiză

Analiza lipidelor pune probleme deosebite faţă de alte clase de substanţe, privind solvenţii organici aleşi, păstrarea extractelor şi soluţiilor standard. Sângele, la temperatura camerei, poate să conducă la o redistribuire spontană a colesterolului, colesterolului esterificat şi fosfolipidelor prin acţiunea sistemului lecitin – colesterol – aciltransferază. Sângele trebuie recoltat la 12-14 ore de la ultima masă. Funcţie de ce s-a ingerat, există un efect redus asupra colesterolului, dar considerabil asupra trigliceridelor. Chilomicronii sunt în mod normal absenţi în plasmă, înainte de a mânca.

Lipidele totale reprezintă întregul material lipidic ce se poate extrage dintr-o probă de sânge. Determinarea acestora constituie un **screening** test care nu poate indica în care fracţiune lipidică există o anomalie sau o uşoară creştere. Nici o metodă nu este simplă şi fidelă. Procedeele gravimetrice sunt doar cele mai directe tehnici cantitative. Detectarea lipidelor totale se poate face fie prin măsurarea turbidităţii, prin tratarea lor cu un reactiv apos, prin extracţie preliminară şi cuantificarea lor prin microoxidare, prin saponificare şi titrarea acizilor graşi rezultaţi, sau prin cântărirea reziduului lipidic al unui alicot de extract.

Tehnicile turbidimetrice s-au folosit ca procedee screening sau cantitative. Prin această modalitate nu s-a putut controla uşor mărimea particulei; fluctuaţiile de temperatură influenţează rezultatele şi diverşi componenţi lipidici îşi variază turbiditatea când alţi factori sunt constanţi. Procedeele turbidimetrice nu se corelează, în genere, cu cele gravimetrice.

Tehnicile gravimetrice implică amestecul Bloor (etanol şi eter etilic), uscare, reextracţie cu eter de petrol, uscare şi cântărire. Extractele amestecurilor etanol-eter cuprind şi substanţe nelipidice ce se elimină în proporţie crescută cu eterul de petrol. Restul rămas este insolubil în eter de petrol, dar devine solubil în prezenţa lipidelor. Metoda Folch, ce foloseşte extracţia cu cloroform-metanol, elimină cea mai mare parte de material nelipidic, dar este mult mai laborioasă.

Van Slyke şi Plazin au propus o metodă de coprecipitare a proteinelor cu lipidele. Compuşii din extract solubili în apă se îndepărtează prin spălare cu apă, iar lipidele, cu unul din amestecurile amintite mai sus.

Lipidele totale se pot determina şi colorimetric, reacţie ce se bazează pe faptul că, după oxidarea lipidelor nesaturate la cetone sau cetoli cu acid sulfuric fierbinte, acestea se condensează cu vanilina în mediu acid (acid fosforic). Printr-o nouă condensare se formează un produs mult mai nesaturat, ce absoarbe în vizibil. Culoare obţinută în cazul lipidelor nesaturate este variată, cele saturate dau compuşi uşor coloraţi sau incolori. Din această cauză, determinarea lipidelor totale este limitată ca acurateţe.

Acizii graşi neesterificaţi sau acizii graşi liberi sunt semnificativi în anumite tulburări de metabolism şi în evaluarea cauzelor hiperlipoproteinemiei. Excesul de acizi graşi conduce şi la o hiperlipoproteinemie secundară; evacuarea acizilor graşi din sânge de către ficat are ca urmare secretarea lor parţială înapoi, sub formă de lipoproteine. Acizii graşi liberi se pot determina titrimetric, prin separare pe coloane schimbătoare de ioni urmată de metilare şi convertire în acizi hidroxamici, prin metode gaz cromatografice sau cromatografie pe strat subţire, prin formare de săpunuri de cupru sau cobalt, urmată de extracţie cu un solvent mai uşor ca apa.

Acizii graşi sunt extraşi din plasmă acidificată cu un amestec de solvenţi, extractul purificat se titrează cu o bază, ţinându-se seamă şi de acţiunea CO_2 din aer ce ar consuma din aceasta. Colorimetric, acizii graşi sunt trecuţi în săpunuri cuprice, ionul metalic formând un complex colorat. Prin hidroliză

alcalină şi conversia ulterioară a acizilor graşi în esterii metilici corespunzători cu ajutorul diazometanului, profilele acestor compuşi se cuantifică prin gaz-lichid cromatografie.

Trigliceridele, alături de colesterol, s-au identificat ca factori de risc legaţi de boala aterosclerotică. În circuitul sanguin, trigliceridele se transportă ca o parte de lipoproteine (în special chilomicroni şi VLDL) care sunt solubile în solvenţi mai polari decât cei utilizaţi obişnuit. Determinarea trigliceridelor se face prin diferenţa dintre lipidele totale şi fosfolipide ce se însumează cu colesterolul liber şi esterificat. Determinarea trigliceridelor prin diferenţă se mai poate face prin saponificarea extractului lipidic şi determinarea glicerolului lipidic. Glicerolul din fosfolipide, calculat din determinarea fosforului lipidic, se scade şi se obţine o valoare pentru glicerolul trigliceridic. Glicerolul mono- şi digliceridelor se include de asemenea ca glicerol trigliceridic. Lipidele se extrag din probă şi fosfolipidele se îndepărtează prin absorbţie pe o coloană de zeolit, acid silicic sau silicat de magneziu. Esterii rămaşi se transformă în hidroxamaţi, care împreună cu săruri ferice în mediu slab acid dau un complex colorimetrabil.

Hidroliza trigliceridelor se face enzimatic sau cu alcalii, când se eliberează glicerolul, care apoi se măsoară prin procedee enzimatice, colorimetrice sau fluorimetrice.

Fosfolipidele prezintă un interes mai redus ca determinare, de când a crescut cel pentru trigliceride şi colesterol. În icterul obstructiv sau hipolipoproteinemie, evaluarea fosfolipidelor totale sau a constituenţilor săi majori are, totuşi, valoare. Concentraţia fosfolipidelor totale variază în acelaşi sens cu concentraţia colesterolului total. Analiza fosfolipidelor implică digestia oxidativă a unui extract lipidic purificat, urmat de o măsurare a fosforului anorganic eliberat. Separarea individuală a subclaselor de fosfolipide se poate realiza prin cromatografie pe coloană, strat subţire şi hârtie. Separarea pe strat subţire cuplată cu determinarea fosforului s-a folosit pentru evaluarea cantitativă a fosfolipidelor.

Colesterolul seric are importanţă în diagnosticul hiperlipoproteinemiilor; HDL şi LDL sunt fracţiunile lipoproteice bogate în colesterol. În hepatită, la început, se produce o creştere a colesterolului; pe măsură ce boala devine mai severă, nivelul său scade. În sindromul nefrotic apar nivele crescute de colesterol, alături de trigliceride şi fosfolipide. Diabetul este asociat cu hipercolesterolemia şi cu hipertrigliceridemia. Există o corelaţie strânsă între nivelele crescute de colesterol, ateroscleroză şi bolile de inimă.

Metodele de determinare ale colesterolului se sprijină pe cele două elemente reactive ale structurii, anume dubla legătură şi gruparea hidroxil. Fiind un alcool, colesterolul reacţionează cu acizii concentraţi conducând la produşi coloraţi. Uneori reacţia cu aceşti agenţi este accelerată prin adiţia diverşilor ioni metalici, cum ar fi cel de fier. Funcţie de concentraţia relativă a acidului sulfuric şi de prezenţa sau absenţa Fe^{3+} se obţine fie coloraţia verde (reacţia Liebermann Burchard) sau roşie. Absorbanţa obţinută în prezenţa Fe^{3+} a complexului verde este de 5 ori mai mare faţă de produsul roşu format în absenţa acestuia.

Extracţia completă cere disocierea legăturii lipidă-proteină. Aceasta o fac diverşii solvenţi organici: cloroformul, parţial; eterul de petrol, amestecul Bloor – complet ca şi alţi solvenţi organici şi acizi. De obicei extracţiile se însoţesc de încălzire.

Extractele cu solvenţi organici conţin atât colesterol şi esterii săi, cât şi alte substanţe (uree, glucoză etc.). Metoda frecvent folosită izolează colesterolul prin precipitare cu digitonină; colesterolul se recuperează prin tratare cu piridină sau anhidridă acetică.

Determinarea colesterolului se poate face gravimetric, nefelometric, gaz cromatografic, prin cromatografie pe strat subţire, prin titrare coulometrică, fluorimetric sau turbidimetric. Cel mai des se folosesc metodele fotometrice. Colesterolul ca şi alţi steroizi dă colorații intense prin tratare cu acizi, colorații ce depind de acidul folosit, concentraţia sa etc. Reacţia Liebermann-Burchard constă din acţiunea cloroformului, a anhidridei acetice şi a acidului sulfuric concentrat asupra colesterolului. Produsul colorat obţinut este de culoare verde. Reacţia Salkovski elimină anhidrida acetică, când se obţine o coloraţie roşie purpurie. Steroizii având două duble legături sau fiind capabili de a le forma prin dehidrogenare, dau o coloraţie când sunt trataţi numai cu acid. Este clar că steroidul final se converteşte în glucid polimeric nesaturat prin deshidratare, sulfonare şi polimerizare.

Alte reacţii de culoare ca reacţia Ciugaev (cu clorură de acetil şi clorură de zinc în acid acetic) sau cu clorură ferică şi acid sulfuric au principiul similar. Ele folosesc fie acizi slabi, fie agent oxidant ce poate creşte lungimea lanţului existent în conjugat. Reacţia cu clorură ferică şi acid sulfuric implică oxidarea datorită unei cantităţi definite de Fe^{3+} ce este redus la Fe^{2+}, cantitatea fiind proporţională cu colesterolul prezent.

Multe tehnici au folosit metoda Liebermann-Burchard: Bloor, Schopenheimer şi Sperry, Abell, Carr şi Drekter cu diverse variante.

Culoarea este complexă şi afectată de multe variabile: concentraţia acidului sulfuric şi de apă, conţinutul de acid acetic al anhidridei acetice, solventul folosit, timpul de reacţie, efectul luminii şi al temperaturii. Absorbţia maximă este cuprinsă între 430-630 nm.

Metoda Pearson, Stern, Mc Gavack foloseşte acidul p-toluen sulfonic. Metoda Lipschitz cu clorură ferică şi acid sulfuric este mai sensibilă ca reacţia Liebermann-Burchard.

O metodă directă a colesterolului cuprinde un singur reactiv stabil, format din acid sulfuric, acetat de etil şi perclorat feric şi nu cere extracţia serului. Ea nu interferă cu bilirubina şi Hb.

Ca metodă de referinţă pentru colesterol se alege metoda Abell, sau modificarea sa după Andersen şi Keys. Metoda Abell saponifică esterii de colesterol serici sau plasmatici prin incubare cu hidroxid de potasiu alcoolic. Colesterolul liber se extrage cu eter de petrol. O parte din extract este uscat şi colesterolul se determină fotometric printr-o reacţie Liebermann-Burchard modificată (anhidridă acetică-acid sulfuric-acid acetic).

Wybeng a emis o metodă de determinare a colesterolului total prin care colesterolul liber şi esterificat reacţionează cu un reactiv combinat (acetat de etil, acid sulfuric, perclorat feric). Culoarea roşie se măsoară la 610 nm.

Frecvent se foloseşte metoda prin care colesterolul formează compuşi de culoare brună-verde cu anhidrida acetică şi acid sulfuric concentrat la temperatura camerei. Prin această variantă nu sunt necesare extracţia şi deproteinizarea.

3.6. Acizii nucleici

Acizii nucleici, ce se găsesc în două forme structurale de bază, acidul dezoxiribonucleic (ADN) şi acidul ribonucleic (ARN), sunt macromolecule ce răspund de depozitarea şi transferul informaţiei genetice necesare obţinerii proteinelor.

Acidul dezoxiribonucleic (ADN) determină proprietăţile unei celule vii prin:

– controlul sintezei proteinei;

– transferul şi răspunderea pe care o are pentru mesajul biologic de la o generaţie la următoarea, fapt esenţial pentru transmiterea informaţiei genetice.

Datorită naturii sale chimice, ADN are o capacitate informaţională enormă. Informaţia este păstrată în ADN, care are o capacitate mare de codificare, de unde se dovedeşte că nu este numai o "bancă de memorie", ci este caracterizată printr-o bază de înţelegere prin modul în care "traduce" informaţia în proteine.

Structura ADN este constituită din polimeri ai nucleozid monofosfaţilor sau nucleotizi care sunt formaţi dintr-o pentoză (glucidă), o bază azotată şi o grupare fosfat. Compoziţia sa chimică se poate sintetiza, în consecinţă, precum urmează:

– O glucidă cu 5 C în formă ciclică, 2'-dezoxiriboză (riboză cu un oxigen lipsă) cu numai o singură grupare oxidril în poziţia 3' a lanţului glucidic;

– Baze azotate ataşate printr-o legătură glicozidică de C al glucidului nucleotidului care sunt purine (adenină-A şi guanină-G) şi pirimidine (citozină-C şi tiamină-T). C1 al dezoxiribozei este legat de N 9 al purinei şi de N 1 al pirimidinei. Configuraţia acestei legături N-glicozidice este β (baza se leagă deasupra planului inelului glucidic);

– O grupare fosfat puternic acidă (ce imprimă acidului nucleic acest caracter) ataşată de oxigenul oxidrilic în poziţiile 5' sau 3' ale glucidului (mai des poziţia 5').

Scheletul invariabil al ADN este dezoxiriboza legată de gruparea fosfat. Oxidrilul 3' al glucidului unuia dintre dezoxiribonucleotizi se leagă de oxidrilul 5' al glucidului adiacent printr-o punte fosfodiester. Partea variabilă este constituită din cele 4 feluri de baze. Unităţile nucleotidice corespunzătoare se numesc dezoxiadenilat, dezoxiguanilat, dezoxicitidilat şi dezoxitimidilat. Schematic, structura lanţului ADN se reprezintă ca o linie verticală ce constituie glucidul, A, C, G, T bazele azotate, iar P aşezat în diagonală arată legătura fosfodiester. Linia diagonală uneşte capătul unei linii verticale cu mijlocul celeilalte, unire ce se referă la 5' OH, respectiv 3' OH. De exemplu, P arată că dezoxiadenilatul este legat de dezoxicitidină printr-o punte fosfodiester şi OH-3' al dezoxiadenilatului printr-o grupare fosforil de OH-5' al dezoxicitidinei.

ADN este un polinucleotid, iar între acesta şi proteină se poate face o analogie: primul rezultă din condensarea nucleotidelor aşa cum proteina se obţine prin polimerizarea aminoacizilor. Similaritatea acestor două structuri avantajează transferul informaţiei genetice între aceste două clase distincte de macromolecule.

Structura tridimensională a ADN (dublu helix- forma B) a fost dată, în 1953, de Watson şi Crick care au folosit datele de difracţie cu raze X ale lui Franklin şi Wilkins. Deşi în prezent se ştie că ADN poate adopta diferite conformaţii, dublul helix a lui Watson şi Crick este predominant şi cunoscut ca ADN- forma B. Caracteristicile modelului ADN sunt următoarele:

a) Doi polimeri sau două lanţuri polinucleotidice helicoidale se înfăşoară în jurul unei axe comune, într-o orientare spre dreapta; fiecare are o polaritate opusă faţă de celălalt, adică atunci când un schelet fosfat-glucidă are o simetrie 5' la 3', lanţul pereche adiacent este orientat invers în direcţia 3' la 5'. Se consideră astfel că cei doi polimeri sunt antiparaleli.

b) Bazele azotate se află în interiorul helixului, grupările fosfat şi dezoxiriboza în exteriorul său. Planul bazelor azotate este perpendicular faţă de axa helixului, iar scheletul glucidelor şi gruparea fosfat în unghi drept faţă de cel al bazelor. Legătura de hidrogen şi interacţiile van der Waals ale perechilor de baze azotate dau stabilitatea termodinamică dublului helix.

c) Structura helicoidală se repetă după 10 perechi de baze ale fiecărui lanţ; ea apare ca o scară în spirală în care există 10 trepte pentru fiecare rotaţie completă.

d) Cele 12 lanţuri se ţin împreună prin legătura de hidrogen între perechile de baze: adenina cu timina prin două legături de hidrogen şi guanina cu citozina prin trei legături de hidrogen. Totdeauna modelul va avea acelaşi număr de baze adeninice ca şi timinice, acelaşi număr de baze goanozinice ca şi citozinice.

e) Secvenţa bazelor de-a lungul lanţului polinucleotidic nu este restrictivă, ea transferă informaţia genetică.

Specificitatea perechilor de baze este trăsătura esenţială a structurii ADN. Împerecherea A cu T şi G cu C se datorează factorilor sterici şi a legăturii de hidrogen. Natura helicoidală regulată a scheletului glucid-fosfat

din fiecare lanţ polinucleotid impune restricţia sterică. Spaţiul este perfect potrivit pentru o pereche purină-pirimidină, insuficient pentru două purine şi mult prea mare pentru două pirimidine, acestea din urmă fiind prea departe pentru a forma legături de hidrogen. A nu se poate împerechea cu C deoarece ar fi doi hidrogeni lângă una din poziţiile de legătură şi nici unul lângă cealaltă. În acelaşi fel G nu se poate împerechea cu T. În schimb, A formează două legături de hidrogen cu T, iar G trei legături de hidrogen cu C, orientate şi distanţate optim pentru a atinge o atracţie maximă între baze.

Mediul apos al celulei dă posibilitatea ca structura ADN să nu fie fixă, să adopte o varietate de structuri. ADN – forma B predomină în celulă; pe lângă aceasta, însă, s-au descris şi formele A şi Z. Forma A adoptată de ARN este mai compactă ca forma B. În schimb, forma Z este cu totul diferită de cele două anterioare; helixul este rotit spre stânga, mult mai elongat decât forma B şi este mai lung şi mai subţire ca acesta. ADN – forma Z implică un aranjament al scheletului fosfodiester polinucleotidic în zig-zag.

Păstrând paralelismul cu proteinele, aşa cum aminoacizii se pot modifica după translaţie, bazele din ADN se pot modifica după sinteza ADN. Cea mai obişnuită modificare este metilarea citozinelor cu producerea metilcitozinelor. Pe lângă faptul că prezenţa acestora în gene se corelează cu genele inactiv transcripţional, în secvenţele dubletelor alternante CG se favorizează tranziţia ADN de la forma B la forma Z.

Dublul helix al ADN are o capacitate deosebită de a se desface şi a se reasocia din nou, fapt extrem de important în procesul replicării şi transcripţiei. Astfel, sub acţiunea acizilor, bazelor ce ionizează bazele cu azot existente în structură, sau a temperaturii, legăturile de hidrogen ce ţin cele două lanţuri ale dublului helix se rup, proces ce se numeşte *denaturare*, iar când este cauzat de modificarea temperaturii, *topire*. Temperatura de topire, Tm este definită ca temperatura la care jumătate din structura helicoidală se pierde, este denaturată.

ADN absoarbe în u.v. datorită naturii heterociclice aromatice a constituenţilor săi purinici şi pirimidinici, având maximul la 260 nm. Prin denaturare, absorbţia la 260 nm creşte, fenomen numit *efect hipercromic*. Compoziţia bazelor cu azot din structura ADN afectează Tm. Energia de rupere a trei legături de hidrogen a perechii de baze GC este mai mare decât cea pentru două legături de hidrogen necesară perechii de baze AT.

Procesul invers denaturării, numit *reasociere* sau uneori *călire*, implică reformarea dublului helix prin unirea celor două lanţuri ale sale, în aşa fel încât să reapară perechile de baze iniţiale. După aceasta, bazele complementare, restul moleculei se refac rapid. În acest caz, absorbanţa la 260 nm scade, fenomen numit *efect hipocromic*. Reasocierea este strict dependentă, pe de-o parte de temperatura soluţiei lanţurilor complementare care trebuie să se găsească sub Tm a formei lor duplex şi pe de altă parte de concentraţia lor.

Uşurinţa cu care dublele helixuri se desfac şi apoi se reasociază este crucială pentru funcţiile biologice.

ADN poate avea formă lineară sau circulară şi există în unul sau mai mulţi cromozomi. Cu cât un organism conţine mai mult ADN, potenţialul său genetic este mai mare.

De obicei ADN apare sub formă circulară, respectiv ADN linear formează o legătură fosfodiester între terminalele 3' şi 5' libere ale polinucleotidului ce le uneşte. Se găseşte mai puţin şi sub formă lineară, când de valoarea lungimii moleculei depinde numărul de proteine codificate şi chiar sub formă intermediară, între lineari şi circulară. Pentru ca ADN să se găsească într-un nucleu de celulă trebuie să fie într-o formă compactă. Flexibilitatea sa structurală îi permite să adopte structuri mai compacte decât forma simplă, lineară a ADN-B. ADN-ul circular ce nu suferă rotire deosebită de superhelix se defineşte ca ADN "relaxat". ADN circular se poate răsuci, însă, într-o formă superhelicoidală orientată spre dreapta (pozitiv) sau spre stânga (negativ), având o energie liberă superioară ADN-lui "relaxat". Superhelixul pozitiv este rotit în aceiaşi direcţie în helixul orientat spre dreapta faţă de axă a formei ADN-B, cel negativ este rotit în direcţie opusă. Din punct de vedere al stress-ului torsional a superhelixului, cel negativ poate cauza o desrăsucire (desfacere) localizată a dublului helix sau să existe ca o formă superhelicoidală compactă.

Topoizomerazele sunt enzimele ce alterează superhelixul ADN-lui celular afectând topologia ADN, enzime de marcantă semnificaţie în procesul de replicare. Tipul I de topoizomeraze desface numai o catenă a ADN, tipul II ambele catene deodată cu consum de ATP. De fapt, topoizomerazele II sunt ATP-aze.

Acidul ribonucleic (ARN) are o mulţime de roluri în celulă, multe dintre ele diferite de ale ADN. Nu este mai stabil în celulă faţă de ADN. Structura sa este analoagă cu cea a ADN, adică este un polimer lung neramificat format din nucleotizi legaţi prin legături 3'–5' fosfodiesteri. Spre deosebire de ADN, ARN are ca unitate glucidică riboza ce conţine o grupare 2' OH ce nu se găseşte în dezoxiriboză. De asemenea, cu bazele azotate pe care le conţine, comparând cu ADN, în loc de T are U (uracil).

ARN nu poate forma un dublu helix de tip ADN-B datorită interferenţelor sterice ale grupărilor 2' OH ale unităţilor sale ribozice; adoptă, totuşi, o formă helicoidală dublu modificată, în care perechile de baze sunt înclinate faţă de perpendiculara la axa helicoidală, structură asemenea ADN-A. A se împerechează cu U prin două legături de hidrogen şi perechile G şi C prin trei legături de hidrogen.

ARN este o moleculă dinamică privind conformaţia; uneori are rol structural, alteori interacţionează extensiv cu proteine specifice sau au funcţii catalitice ce le conferă capacitatea de a forma structuri foarte complexe.

Bazele de structura ARN se pot modifica după ce ARN este sintetizat. Metilarea numeroaselor poziţii ale diferitelor baze sunt modificările cele mai uzuale, care permit ca împerecherea bazelor neobişnuite să crească diversitatea structurală a ARN.

ARN se clasifică în mai multe variante, dintre care cea clasică include 3 categorii, respectiv ARN de transfer, ribozomal şi mesager.

ARN de transfer (ARNt) se prezintă sub formă de moleculă relativ mică, care transportă specific aminoacizi în procesul de biosinteză a proteinelor pe ribozomi.

ARN ribozomal (ARNr) este cuprins în locul de asamblare pentru sinteza peptidelor alături de ribozomi şi proteinele ribozomale.

ARN de transfer (ARNt) conţine doar cele 4 baze majore şi serveşte ca matriţă pentru sinteza proteinelor, transportând informaţia de la ADN spre locul de sinteză a proteinelor celulare. Acest tip de ARN se sintetizează în nucleu, în procesul de transcripţie prin care secvenţa bazelor dintr-un lanţ ADN cromozomial este copiat enzimatic pe lanţul său. Cel mai greu modificabil ARN este ARNt. Modificările au ca scop obţinerea trăsăturilor structurale unice ale ARNt ce sunt cruciale pentru funcţia sa înaltă de specializare.

Sinteza proteinelor implică o relaţie strânsă de interdependenţă între cele 3 tipuri de ARN a căror sinteză trebuie să fie coordonată cu răspunsul celulei la mediul intra- şi extracelular.

Deşi ADN este rezerva genetică predominantă de informaţie, ARN poate transporta informaţia genetică în secvenţa bazelor şi este util ca genom în unele virusuri.

4 Dinamica chimică: metabolismul celular, biosinteza şi descompunerea biomoleculelor

4.1. Metabolismul normal şi patologic al proteinelor 97
4.1.1. Biosinteza aminoacizilor 97
4.1.2. Biosintezele compuşilor derivaţi din aminoacizi 98
4.1.3. Reglarea biosintezei aminoacizilor 104
4.1.4. Degradarea aminoacizilor şi ciclul ureei 105
4.1.5. Recirculaţia proteică 115
4.1.6. Metabolismul intermediar al proteinelor. Informaţia genetică 119
4.2. Metabolismul normal şi patologic al glucidelor 141
4.2.1. Metabolismul glucidelor. Glicoliza 143
4.2.2. Piruvat-dehidrogenaza şi ciclul acidului citric 158
4.2.3. Transportul de electroni în mitocondrie şi fosforilarea oxidativă ... 167
4.2.4. Căile alternative ale metabolismului glucidelor 181
4.2.5. Gluconeogeneza 188
4.2.6. Metabolismul glicogenului 196
4.3. Metabolismul normal şi patologic al lipidelor 205
4.4. Mecanisme de reglare a metabolismului 222
4.5. Elemente de genetică medicală 243
4.5.1. Anatomia unui cromozom 243
4.5.2. Genele şi mediul înconjurător 245
4.5.3. Recombinările genetice 247
4.5.4. Mecanismul de reparare a erorilor genetice 248
4.5.5. Legile lui Gregor Mendel 249
4.5.6. Garnitura cromozomială a celulelor somatice: cariograma ... 250
4.5.7. Erorile înnăscute ale metabolismului 251
4.5.8. Materialul genetic al citoplasmei 254
4.5.9. Genele dezlănţuite: virusurile 256
4.5.10. Oncogenele 259

4.1. Metabolismul normal și patologic al proteinelor

4.1.1. Biosinteza aminoacizilor

Dintre cei 20 de aminoacizi 9 sunt esenţiali (nu pot fi sintetizaţi în organism şi trebuie să fie achiziţionaţi din dietă). Restul de 11 aminoacizi sunt neesenţiali şi pot fi sintetizaţi de către organism din precursori diferiţi (fig. 19):

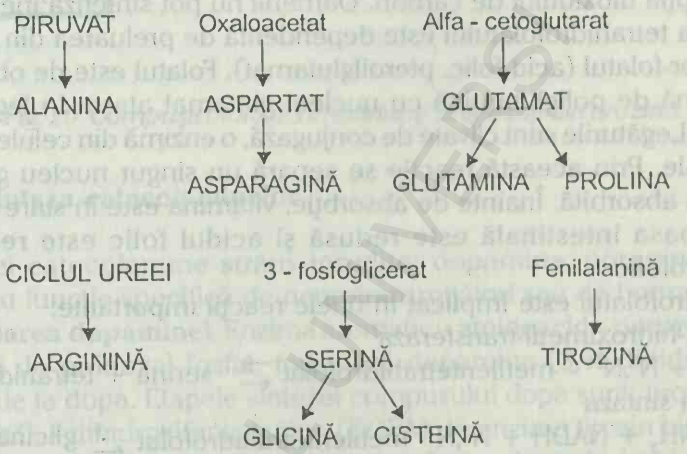


Fig. 19. Precursorii pentru biosinteza aminoacizilor neesenţiali.

1. Alanina poate fi formată de la piruvat prin reacţia de transaminare:

$$\text{GLUTAMAT} + \text{PIRUVAT} \overset{\text{GPT}}{\rightleftarrows} \text{- } \alpha \text{ CETOGLUTARAT} + \text{ALANINA}$$

2. Aspartatul poate fi format de la oxalacelat prin reacţia de transaminare:

$$\text{GLUTAMAT} + \text{OXALACETAT} \overset{\text{GOT}}{\rightleftarrows} \alpha \text{ -CETOGLUTARAT} + \text{ASPARTAT}$$

3. Asparagina poate fi formată prin amidarea aspartatului.

4. Glutamatul poate fi format prin amidarea reductivă a alfacetoglutaratului de către glutamat dehidrogenază.

5. Glutamina poate fi formată prin amidarea glutamatului.

6. Prolina poate fi formată în două etape pornind de la glutamat.

7. Arginina este formată în cursul ciclului ureei.

8. Serina poate fi sintetizată în două etape pornind de la 3-fosfoglicerat, un intermediar în glicoliză.

9. Glicina este convertită din serină prin serin hidroximetiltransferaza, o enzimă care foloseşte piridoxalfosfatul şi tetrahidrofosfatul drept cofactori.

10. Cisteina poate fi sintetizată de la serină şi metionină. Deci cisteina este un aminoacid neesenţial dacă metionina este furnizată prin dietă.

11. Tirozina este un aminoacid neesenţial numai dacă fenilalanina este furnizată prin dietă.

Aminoacizii sunt o formă de intrare majoră în rezervorul substanţelor cu 1 C. Transferul grupelor cu 1 C se produce frecvent în metabolism. Aceste fragmente de 1 C dintr-un rezervor de aminoacizi existent, pot fi făcute disponibile. Pentru transportul acestor fragmente în diferite stări de oxidare sunt folosiţi diferiţi transportori:

– Biotina este un transportor pentru dioxidul de carbon;

– Tetrahidroxifolatul transportă grupările cu 1 C ale tuturor stărilor oxidate, cu excepţia dioxidului de carbon. Oamenii nu pot sintetiza inelul pterină şi formarea tetrahidrofolatului este dependentă de preluarea din dietă a unui precursor-folatul (acid folic, pteroilglutamat). Folatul este de obicei în dietă sub formă de poliglutamină cu nucleul glutamat ataşat în legături gama-peptidil. Legăturile sunt clivate de conjugază, o enzimă din celulele mucoasei intestinale. Prin această reacţie se separă un singur nucleu glutamat din vitamina absorbită. Înainte de absorbţie, vitamina este în stare oxidată, dar în mucoasa intestinală este redusă şi acidul folic este redus la acid tetrahidrofolic.

Tetrahidrofolatul este implicat în unele reacţii importante:

1) Serin-hidroximetil-transferaza

Glicina + N^5,N^{10} – metilentetrahidrofolat $\rightleftarrows$ serina + tetrahidrofolat

2) Glicin sintaza

CO_2 + NH_3 + NADH + N^5,N^{10} metilentetrahidrofolat $\rightleftarrows$ glicina + tetrahidrofolat + NAD^+

3) Homocistein metiltransferaza

Homocisteina + N^5,N^{10} tetrahidrofolat $\rightleftarrows$ metionina + tetrahidrofolat

4.1.2. Biosintezele compușilor derivați din aminoacizi

Tabelul 6

Compuşii derivaţi din aminoacizi

Compus	Aminoacidul precursor	Funcţia primară
DOPAMINA	TIROZINA	neurotransmiţător
EPINEFRINA	TIROZINA	hormon
GABA*	GLUTAMAT	neurotransmiţător
HISTAMINA	HISTIDINA	vasodilatator
MELANINA	TIROZINA	pigment
MELATONINA	TRIPTOFAN	hormon
NOREPINEFRINA	TIROZINA	neurotransmiţător
SEROTONINA	TRIPTOFAN	vasoconstrictor
TIROXINA	TIROZINA	hormon

* – GABA = Gama-aminobutirat

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

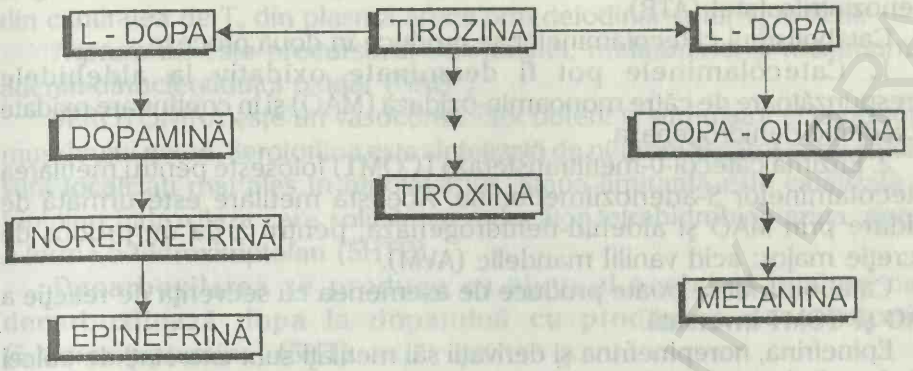


Fig. 20. Compuşii biologici importanţi sintetizaţi din tirozină.

A. Biosinteza catecolaminelor

Cele trei catecolamine strâns înrudite: dopamina, norepinefrina şi epinefrina au funcţie specifică de neurotransmiţători sau de hormoni.

a) **Formarea dopaminei**. Enzima aromatic – aminoacid – decarboxilaza, dependentă de piridoxal fosfat, formează dopamina (3, 4 dihidroxifenil-letilamina) de la dopa. Etapele sintezei compusului dopa sunt: tirozina este hidrolizată la 3, 4 dihidroxifenilalanina (DOPA) de enzima tirozin hidroxilaza cu funcţie mixtă (şi de oxidază) şi solicită cofactorul tetrahidrobiopterina). Nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfatul redus (NADPH) este reducătorul în regenerarea tetrahidrobiopterinei. Această etapă nu este limitatoare. Hidroxilarea tirozinei este etapa limitantă în biosinteza catecolaminelor. Enzima este alosterică; cu dopamina, norepinefrina şi epinefrina acţionează ca efector negativ.

Dopamina este un neurotransmiţător, în special în unii neuroni ai ganglionilor bazali.

b) **Formarea norepinefrinei**. Norepinefrina este o dopamină beta-hidroxilată.

Enzima conţine cupru şi solicită ascorbat şi oxigen molecular pentru funcţionarea sa.

Norepinefrina este un transmiţător neural major al sistemului nervos simpatic.

c) **Formarea epinefrinei**. Norepinefrina este metilată în medudosuprarenală de feniletanolamina-N-metiltransferaza şi formează epinefrina, folosind ca donor de metil S-adenozilmetionina.

Sinteza enzimei este indusă de glucocorticoizii din corticosuprarenala înconjurătoare şi producerea ei este inhibată de epinefrină, un hormon important, care reglează multe căi metabolice.

Epinefrina este stocată în granulele din medulosuprarenală asociată cu adenozintrifosfatul (ATP).

Catabolismul catecolaminelor se produce în două procese.

1. Catecolaminele pot fi deaminate oxidativ la aldehidele corespunzătoare de către monoamin-oxidaza (MAO) şi în continuare oxidate de aldehid-dehidrogenaza.

2. Enzima catecol-0-metiltransferaza (COMT) foloseşte pentru metilarea catecolaminelor S-adenozilmetionina. Această metilare este urmată de oxidare prin MAO şi aldehid-dehidrogenaza, pentru a da un produs de excreţie major: acid vanilil mandelic (AVM).

Catabolismul se poate produce de asemenea cu secvenţa de reacţie a MAO şi COMT inversată.

Epinefrina, norepinefrina şi derivaţii săi metilaţi sunt excretaţi de obicei sub formă de conjugaţi cu sulfat sau acid glucuronic. Cantitatea de AVM excretată este folosită ca ajutor în diagnosticul tumorii de corticosuprarenală.

B. Biosinteza melaninelor

Melaninele sunt pigmenţi biologici. Sinteza lor se produce numai în celulele producătoare de pigmenţi, numite melanocite. În aceste celule, melaninele sunt sintetizate din tirozină mai multe etape.

În prima etapă, tirozina este convertită în DOPA (ca şi în biosinteza catecolaminelor). Cu toate acestea în melanocite reacţia este catalizată de o enzimă diferită: tirozinaza.

Tirozinaza catalizează de asemenea şi reacţia următoare, care este oxidarea produsului DOPA la dopaquinonă. Dopaquinona este apoi convertită la melanină.

Cofactor: Tirozinaza nu solicită tetrahidrobiopterina, dar utilizează drept cofactor cupru.

Defect: Un defect al tirozinazei produce dereglarea metabolică cunoscută sub numele de albinism. Indivizii afectaţi de această dereglare, cunoscuţi sub denumirea de albinoşi, sunt lipsiţi de pigmentaţie deoarece fără tirozinază nu pot converti tirozina în DOPA şi aceasta în dopaquinonă şi în melanocite nu se pot sintetiza melanine.

C. Biosinteza tirozinei şi triiodotironinei

Glanda tiroidă secretă doi derivaţi iodinaţi ai tirozinei care funcţionează ca hormoni:

a) 3,3', 5,5' – tetraiodotironina (tiroxina sau T_4)

b) 3,3', 5 triiodotironina (T_3).

Hormonii sunt formaţi în celulele foliculare ale glandei tiroide prin iodinarea reziduurilor de tirozină, care se găsesc în legătura peptidică a tiroglobulinei. Se formează întâi reziduurile monoiodo- şi diiodotirozina şi acestea reacţionează apoi pentru a forma T_3 şi T_4.

Tiroglobulina iodinată este stocată în lumenul foliculilor tiroidieni până ce aceştia sunt solicitaţi să secrete. T_3 şi T_4 sunt hidrolizaţi atunci din tiroglobulină şi secretaţi în circulaţie. T_3 este forma mai activă şi poate fi

singura formă care se leagă de nucleii celulelor. Aproximativ două treimi din cantitatea de T_3 din plasmă apare prin deiodinarea lui T_4 în ficat.

Triptofanul este precursorul serotoninei, melatoninei şi nicotinamid-adenin-dinucleotidului oxidat (NAD^+).

SEROTONINA este un vasoconstrictor potent şi stimulator al contracţiei muşchiului neted. Serotonina este sintetizată de neuroni ai căror corpi celulari sunt localizaţi mai ales în hipotalamus. Etapa limitantă este catalizată de triptofan hidroxilaza care solicită ca reducător tetrahidrobiopterina, pentru a forma 5-hidroxitriptofan (5HTP).

Decarboxilarea se produce cu ajutorul aceleiaşi enzime care decarboxilează dopa la dopamină cu producere de serotonină (5-hidroxitriptamina) (5HT).

Serotonina este stocată în granule în asociaţie cu ATP.

MELATONINA este un hormon produs de glanda pineală, cu efecte pe sistemul hipotalamic-pituitar. 5-HT este formată în glanda pineală şi convertită la 5-hidroxi-N-acetiltriptamina cu ajutorul enzimei N-acetiltransferaza. 5-hidroxi-N-acetiltriptamina este apoi metilată de o metiltransferază şi 5-adenozilmetionina la melatonină.

GABA (gama-aminobutirat) are drept precursor glutamatul. GABA pare să fie un inhibitor al transmiterii impulsului nervos în creier şi bulbul cefalo-rahidian.

Este format din L-glutamat cu ajutorul glutamat-decarboxilazei, o enzimă dependentă de piridoxal fosfat.

GABA este metabolizată în neuroni la succinat, depăşind etapa α-cetoglutarat dehidrogenaza a ciclului acidului citric.

HISTAMINA are precursor histidina. Funcţiile histaminei sunt:

– Este un vasodilatator potent şi poate fi un transmiţător neural. Ea se eliberează în timpul reacţiilor alergice.

– Medicamentele antihistaminice sunt compuşi care au o structură similară histaminei şi pot preveni schimbările fiziologice care se produc în timpul reacţiilor alergice.

Biosinteza histaminei: histidin decarboxilaza catalizează formarea histaminei din L-histidină.

Degradarea histaminei se produce prin: metilarea unui azot imidazol, urmată de oxidare prin MAO sau prin oxidarea directă prin MAO.

GLUTATIONUL este un dipeptid format din glutamat, cisteină şi glicină. Glutationul este un compus redox activ, care poate exista fie în forma redusă (de monomer) fie în forma oxidată, care este un dimer. Forma dimeră este formată din monomeri uniţi împreună printr-o legătură disulfit între cistein-sulfhidrili.

În celulă glutationul are o funcţie importantă: serveşte ca tampon sulfhidril reglând starea redox a celulei prin menţinerea unui echilibru între forma redusă şi cea oxidată; în unele celule joacă un rol în transportul de aminoacizi prin membrana plasmatică; serveşte drept cofactor pentru unele enzime ca glutation-peroxidaza, care foloseşte glutationul redus pentru peroxizi.

CREATIN-FOSFATUL este format din glicină, arginină şi 5-adenozilmetionină.

Creatin fosfatul este un compus înalt energetic, foarte important pentru stocarea fosfatului. Se găseşte în muşchi şi se formează din 3 aminoacizi.

Sinteza: grupul guanidină al argininei este transferat la glicină pentru a forma guanidinoacetat; N-metilarea guanidinoacetatului de 5-adenozilmetionina, formează creatina; fosforilarea creatinei la creatin fosfat se produce cu consum de ATP.

Formarea şi excreţia creatininei:

1) o fracţiune constantă a *pool*-ului de creatin-fosfat din muşchi se ciclizează spontan la creatinină, care este excretată în urină; 2) excreţia creatininei este foarte constantă la adult şi este raportată la masa musculară, de aceea excreţia de creatinină în 24 de ore poate fi folosită pentru dozare; 3) deoarece creatinina nu are o variaţie diurnă, rata excreţiei de creatinină poate fi folosită ca bază pentru a calcula excreţia altor substanţe. Valorile sunt exprimate ca un raport care compară cantitatea de substanţă investigată, cu cantitatea de creatinină din proba de urină; 4) în sfârşit, creatinina din sânge este un indicator bun pentru funcţia renală, deoarece creatinina este îndepărtată din plasmă foarte eficient de către rinichi.

Poliaminele sunt policationi la pH fiziologic asociate cu componentele celulare cu încărcătură negativă cum sunt membranele şi acizii nucleici. Poliaminele formate din ornitină sunt: putresceina, spermidina şi spermina.

Aminoacizii mai sunt folosiţi şi în sinteza nucleotidelor.

Molecula complexă a hemului are drept precursor glicina şi succinil coenzima A (fig. 21).

Molecula de hem are un grup pirol şi un atom de Fe în centrul inelului porfirinic, care are o structură tetrapirol (fig. 22).

BCU IAŞI CENTRU VECHI

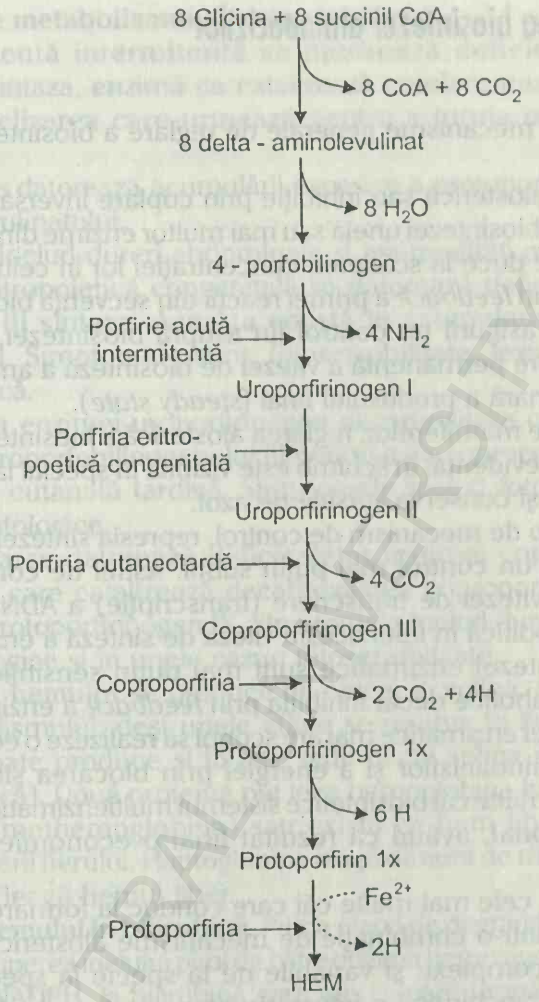


Fig. 21. Biosinteza hemului (reacţiile blocate în bolile metabolice ale sintezei hemului sunt indicate prin săgeţi).

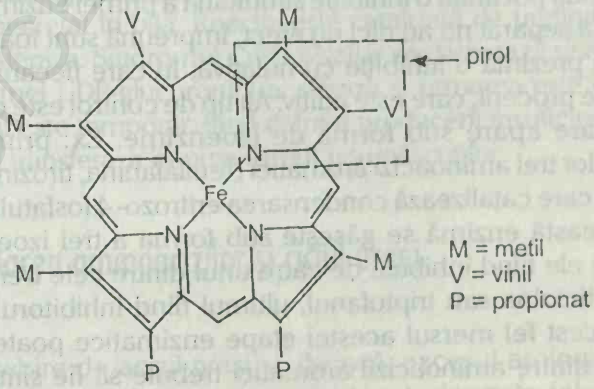


Fig. 22. Structura moleculei de hem.

4.1.3. Reglarea biosintezei aminoacizilor

Sunt două mecanisme generale de reglare a biosintezei aminoacizilor şi anume:

1. reglare alosterică sau inhibiţie prin cuplare inversă (*feedback*);
2. represia biosintezei uneia sau mai multor enzime din calea metabolică respectivă care duce la scăderea concentraţiei lor în celulă.

Inhibiţia prin *feedback* a primei reacţii din secvenţa biosintetică de către produsul final asigură un control fin asupra biosintezei, deoarece poate realiza o ajustare permanentă a vitezei de biosinteză a aminoacidului până la starea staţionară a produsului final (*steady state*).

În ţesuturile mamiferelor, reglarea alosterică a biosintezei aminoacizilor nu este atât de evidentă, în schimb este vizibilă în special la bacterii, datorită nevoii lor de a-şi conserva sursele de azot.

Al doilea tip de mecanism de control, represia sintezei enzimatice, este considerat a fi un control mai puţin subtil. Astfel de control se face prin schimbări ale vitezei de transcriere (transcripţie) a ADN sau a translaţiei ARNm care modifică în felul acesta viteza de sinteză a enzimelor. Represia şi depresia sintezei enzimatice sunt mai puţin sensibile la modificările condiţiilor metabolice decât inhibiţia prin *feedback* a enzimelor reglatoare. Represia sintezei enzimatice mai are scopul să realizeze o economie maximă în folosirea aminoacizilor şi a energiei prin blocarea sintezei enzimelor neutralizate. În multe căi biosintetice sistemul multienzimatic poate fi represat în mod coordonat, având ca rezultat final o economie foarte mare de aminoacizi.

La bacterii, cele mai multe căi care conduc la formarea de aminoacizi sunt reglate printr-o combinaţie de mecanisme alosterice şi de represie, adesea foarte complexe şi variabile de la specie la specie. Atunci când există în calea biochimică o bifurcaţie care conduce la doi sau mai mulţi aminoacizi diferiţi, mecanismele de *feedback* şi represie se complică: cei doi produşi finali pot arăta o inhibiţie simultană a primei enzime din secvenţă, aşa încât dacă separat nu au nici un efect, împreună sunt foarte inhibitori. În alte cazuri ei prezintă o inhibiţie cumulativă, în care fiecare produs inhibă într-un anume procent, care este aditiv. Alt tip de control este dat de o enzimă reglatoare care apare sub formă de izoenzime. Ex: prima enzimă din biosinteza celor trei aminoacizi aromatici (fenilalanina, tirozina şi triptofanul) este aldolaza care catalizează condensarea eritrozo- 4 fosfatului cu fosfoenol-piruvatul. Această enzimă se găseşte sub forma a trei izoenzime diferite, fiecare dintre ele fiind inhibată de către unul dintre cele trei produse finale fenilalanina, tirozina sau triptofanul, ultimul fiind inhibitorul cel mai puţin eficient. În acest fel mersul acestei etape enzimatice poate fi reglat dacă unul sau doi dintre aminoacizii aromatici trebuie să fie sintetizaţi. În plus, biosinteza fiecăruia dintre cele trei izoenzime ale aldolazei este în mod specific represată de produsul final inhibitor corespunzător.

Dereglări ale metabolismului aminoacizilor

1. Porfiria acută intermitentă se datorează deficienţei enzimei uroporfirinogen sintaza, enzimă ce catalizează condensarea a 4 molecule de substrat şi ciclizarea care urmează pentru a forma inelul tetrapirol uroporfirinogen.

Dereglarea se datorează acumulării excesive a protoporfirinogenului şi a delta aminolevulinatului.

Simptomele includ dureri abdominale şi anormalităţi neurologice.

2. Porfiria eritropoietică congenitală se datorează deficienţei enzimei uroporfirinogen III sintaza. Aceasta constă în acumularea excesivă de uroporfirinogen I. Simptomele sunt: fotosensibilitate, leziuni cutanate şi anemie hemolitică.

3. Dereglarea enzimei uroporfirinogen decarboxilaza care catalizează decarboxilarea uroporfobilinogenului III pentru a da coproporfirinogenul III, produce porfiria cutanată tardivă. Simptomele includ fotosensibilitate şi probleme dermatologice.

Coproporfiria se datorează deficienţelor enzimei coproporfirinogen oxidaza, enzima care catalizează decarboxilarea coproporfirinogenului IX pentru a forma protoporfirinogen IX. Simptomele includ dureri abdominale, anomalii neurologice şi în unele cazuri fotosensibilitate.

Degradarea hemului se produce de obicei în splină, care este sediul major al catabolismului, deşi unele etape se produc în ficat. Distrugerea hematiilor se poate produce şi în alte sedii decât splina şi ficatul (ex: în anemia hemolitică). Două proteine pot lega hemoglobina în care fierul este în stare ferică (methemoglobina) sau există ca hem liber. Scopul este prevenirea pierderii fierului. Haptoglobina leagă dimerii de methemoglobină, iar hemopexina leagă hemul liber.

Conversia hemului în bilirubină. Prima etapă de degradare este formarea biliverdinei prin ruperea inelului pirol de către enzima hemoxigenaza. Biliverdina este redusă de NADPH, la bilirubină care are culoare brună-roşiatică şi este puţin solubilă. Bilirubina este transportată la ficat de albumina serică. În ficat bilirubina este conjugată cu acidul glucuronic. Diglucuronatul de bilirubină este solubil şi este secretat în bilă. Reacţia este catalizată de uridindifosfat (UDP)-glucuronil transferaza. Sindromul Crigler-Najjar se datorează unei deficienţe în activitatea enzimei UDP-glucuronil transferaza şi urmarea este un icter sever. Icterul neonatal este temporar, fiind datorat producerii insuficiente de enzimă UDP-glucuronil transferaza în organismul nou-născuţilor.

4.1.4. Degradarea aminoacizilor şi ciclul ureei

Spre deosebire de acizii graşi şi glucoză, excesul aminoacizilor folosiţi pentru sinteza de proteine nu poate fi stocat, dar este folosit în arderile metabolice. Gruparea amino este îndepărtată şi scheletul carbonic ce rezultă

este convertit în intermediari metabolici importanţi: acetil CoA, acetoacetil CoA, piruvat sau intermediari ai ciclului acidului citric. Pe de altă parte, din aminoacizi se pot sintetiza acizi graşi, corpi cetonici şi glucoză. Modul prin care azotul provenit din aminoacizi este metabolizat este acţiunea succesivă a transaminazelor, glutamat dehidrogenazei şi ciclului ureei (figura 23).

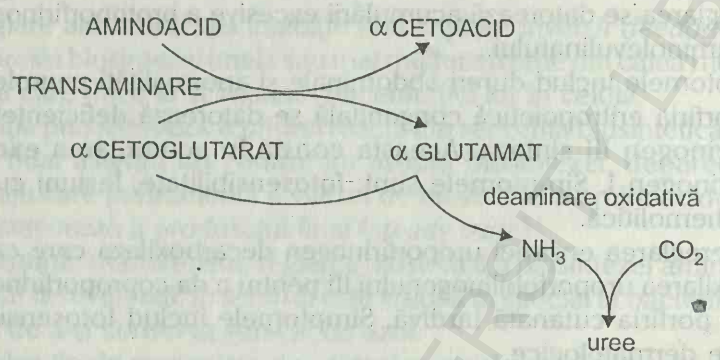


Fig. 23. Căile metabolice ale azotului provenit din degradarea aminoacizilor.

Ciclul ureei

Sediul major al degradării aminoacizilor la mamifere este ficatul. Gruparea alfa-amino a multor aminoacizi este transferată la alfa-cetoglutarat pentru a forma glutamat. Acesta este apoi deaminat oxidativ, cu formarea amoniacului.

Aminoacid → glutamat → NH4

Enzimele care catalizează aceste reacţii sunt numite transaminaze sau aminotransferaze. Transaminazele catalizează transportul unei grupări alfa-amino de la un alfa-aminoacid la un alfa-cetoacid, pentru a-l converti în NH_3. Una dintre cele mai importante enzime din această grupă este aspartat aminotransferaza, care catalizează transferul unei grupări amino a aspartatului la alfa-cetoglutarat.

Aspartat + α-cetoglutarat $\rightleftarrows$ oxalacetat + glutamat

Altă enzimă predominantă în ţesutul mamiferelor este alanin aminotransferaza, care catalizează transferul grupării amino a alaninei la alfa cetoglutarat.

Alanina + α-cetoglutarat $\rightleftarrows$ piruvat + glutamat

Cofactorul esenţial pentru toate transaminazele este piridoxal fosfatul (PLP) care este derivat din piridoxină. În timpul transaminării PLP este convertit în piridoxamin fosfat (PMP). Enzima şi PLP formează cu substratul lor o bază Schiff intermediară. Esmond Snell şi Alexander Braunstein au propus un mecanism de reacţie a transaminării. Baza Schiff care se formează între substratul de aminoacizi şi PLP (numită aldimină) pierde un proton de la alfa-carbon şi formează un intermediar quinonoid. Reprotonarea produce o cetimină, care conţine o dublă legătură între N şi C alfa al substratului (aldimina conţine o dublă legătură între N şi C carboxil al PLP). Cetimina este apoi hidrolizată la un alfa cetoacid şi piridoxamin fosfat.

$Aminoacid_1 + E\text{-}PLP \rightleftarrows \alpha\text{-}cetoacid_1 + E\text{-}PMP$

Aceasta reprezintă prima parte a reacţiei de transaminare. Partea doua a reacţiei se produce printr-o inversare a căii de mai sus. Un al doilea alfa-cetoacid reacţionează cu complexul enzimă-piridoxamin fosfat (E-PMP). Se produce astfel un al doilea aminoacid şi se regenerează complexul enzimă-piridoxal fosfat (E-PLP).

$alfa\text{-}cetoacid_2 + E\text{-}PMP \rightleftarrows aminoacid_2 + E\text{-}PLP$

Suma reacţiilor este:

$Aminoacid_1 + alfa\text{-}cetoacid_2 \rightleftarrows aminoacid_2 + \alpha\text{-}cetoacid_1$

Piridoxal fosfatul este o coenzimă care catalizează multe reacţii de aminoacizi, dintre care cea mai importantă este transaminarea. Alte reacţii la atomul de carbon alfa al aminoacizilor catalizaţi de piridoxal fosfat sunt decarboxilarea, deaminarea, racemizarea şi clivajul aldol. Enzimele piridoxal fosfat catalizează şi reacţii la atomul de carbon beta (ex. triptofan sintetaza) sau reacţii la atomul de carbon gamma al aminoacidului (ex. cistationaza) (figura 24).

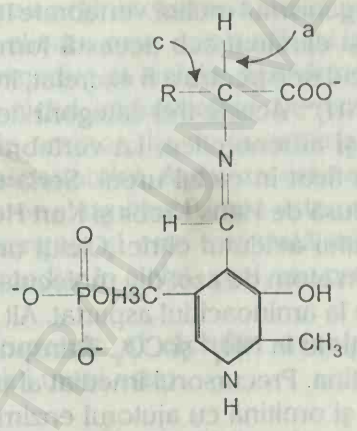


Fig. 24. Modul de acţiune a piridoxal fosfatului. Ex: legătura a este labilizată de aminotransferază; legătura b de către decarboxilaze şi legătura c de aldolază (treonin aldolază).

Aceste reacţii diverse ale piridoxal fosfatului pot fi efectuate datorită formei protonate a enzimei. Aceasta acţionează ca un rezervor de electroni care stabilizează intermediarii catalitici încărcaţi negativ. Deci, piridoxal fosfatul (PLP) este un catalizator electrofilic. Produsul bazei Schiff este apoi hidrolizat. Cu alte cuvinte, desfăşurarea reacţiei catalizate de PLP este sub control stereoelectronic.

Mecanisme alternative pentru deaminarea aminoacizilor. 1. *Aminoacid oxidazele*. Cele două enzime L şi D aminoacid oxidaza se produc în rinichi şi ficat. Activitatea lor este foarte scăzută şi semnificaţia fiziologică nu este clarificată. Reacţia catalizată este:

$Aminoacid + H_2O \rightarrow alfa\text{-}cetoacid + NH_3$

Drept cofactori, enzimele folosesc flavinele, de care sunt strâns legate.

2. *Deaminarea directă prin hidratare*. Serina şi treonina pot fi deaminate direct, deoarece aceşti aminoacizi conţin o grupare hidroxil ataşată la atomul de carbon beta şi deaminarea lor este uşoară. Aceste deaminări directe sunt catalizate de enzimele serin dehidraza şi treonin dehidraza.

Pentru serin dehidraza reacţia este:

$$\text{Serina} \xrightarrow{-H_2O} \text{aminoacrilat} \xrightarrow{+H_2O} \text{piruvat} + NH_4^+$$

Pentru treonin dehidraza reacţia este:

$$\text{Treonina} \xrightarrow{-H_2O} \text{alfa-cetoglutarat} + NH_4^+$$

Aceste enzime se numesc dehidraze pentru că dehidratarea precede deaminarea. Drept cofactor enzimele utilizează piridoxal fosfatul. O parte din NH_4^+ format prin scindarea aminoacizilor este consumat în biosinteza compuşilor azotaţi. În organismul multor vertebrate terestre, excesul de NH_4^+ este convertit în uree şi eliminat sub această formă. La păsări şi reptile, NH_4^+ este convertit în acid uric pentru a fi excretat, în timp ce multe animale acvatice excretă chiar NH_4^+. Aceste trei categorii de organisme se numesc ureotelice, uricotelice şi amonotelice. La vertebratele terestre, ureea se sintetizează exclusiv în ficat în ciclul ureei. Seria de reacţii care duce la sinteza ureei a fost propusă de Hans Krebs şi Kurt Henseleit (1932), cu 5 ani înaintea elucidării ciclului acidului citric. Ciclul ureei a fost primul ciclu metabolic descoperit. Un atom de azot din molecula de uree sintetizată prin această cale provine de la aminoacidul aspartat. Alt atom de azot şi atomul de carbon sunt proveniţi de la NH_4^+ şi CO_2. Transportorul acestor atomi de carbon şi azot este ornitina. Precursorul imediat al ureei este arginina, care este hidrolizată în uree şi ornitină cu ajutorul enzimei arginaza.

$$\text{Arginina} \xrightarrow{+H_2O} \text{Uree} + \text{Ornitina}$$

Alte reacţii din ciclul ureei duc la sinteza argininei de la ornitină (figura 25).

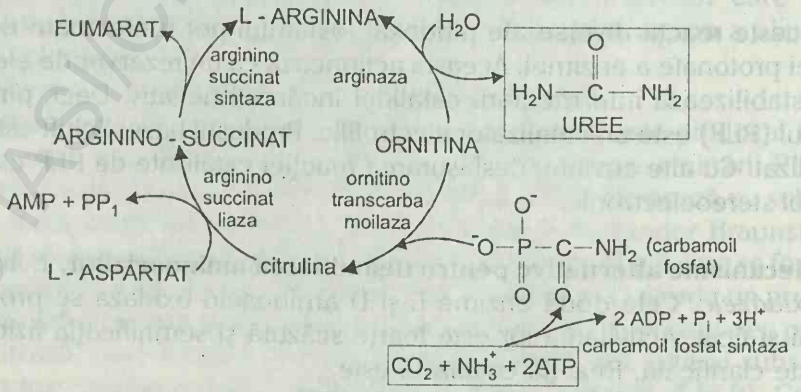


Fig. 25. Reacţiile ciclului ureei.

Prima reacţie este transferul grupei carbamoil fosfat la ornitină pentru a forma citrulina, reacţie catalizată de enzima ornitin transcarbamoilaza. Carbamoil fosfatul este sintetizat din NH_4^+ şi CO_2. Enzima ce catalizează această reacţie complexă este carbamoil fosfat sintetaza cu consumul a două molecule de ATP fapt ce face reacţia ireversibilă. O caracteristică neobişnuită a acestei enzime este aceea că solicită N-acetil-glutamat pentru activitate. Carbamoil fosfatul are potenţial de transfer mare din cauza legăturii anhidre.

Ornitina + carbamoil fosfat → citrulina + P_i (fosfor anorganic)

Citrulina se condensează cu aspartatul pentru a forma arginino-succinat, reacţie catalizată de enzima arginino-succinat sintetaza. Reacţia solicită o moleculă de ATP, care este clivat în AMP şi pirofosfat. Aspartatul pentru această reacţie provine din transaminarea dintre oxaloacetat şi glutamat.

$$\text{Citrulina} + \text{Aspartat} \xrightarrow{\text{ATP} \searrow \text{ADP} + \text{PP}_i} \text{Arginino-succinat}$$

În final, prin clivarea arginino-succinatului se formează arginina şi fumaratul. Reacţia de clivare este catalizată de arginino-succinat liaza. Fumaratul este un intermediar al ciclului acidului citric şi atunci formarea lui leagă ciclul ureei de ciclul acidului citric. De remarcat faptul că reacţiile ce transferă grupele de aminoacizi de la aspartat la arginină, conservă scheletul carbonic al aspartatului. Arginaza este enzima care catalizează scindarea argininei în uree şi ornitină. Ureea este un compus foarte solubil, care intră în circuitul sanguin şi este excretată prin urină. Ornitina poate continua să fie un intermediar în ciclul ureei, sau poate intra în mitocondrie.

Calculul stoechiometric al ciclului ureei. Totalitatea calculului stoechiometric al ciclului ureei este:

$$CO_2 + NH_4^+ + 3ATP + \text{aspartat} + H_2O \rightarrow \text{Uree} + 2ADP + 2P_i + AMP + PPi + \text{fumarat}$$

Ureea formată conţine doi atomi de azot, unul derivat din NH_3 şi unul derivat din aspartat. Pirofosfatul format este hidrolizat rapid şi astfel patru legături ~ P sunt consumate în aceste reacţii pentru a fi sintetizată o moleculă de uree. Sinteza fumaratului în ciclul ureei este importantă pentru că leagă ciclul ureei de cel al acidului citric. Fumaratul este hidratat la malat, care este oxidat la rândul lui în oxalacetat. Oxalacetatul are mai multe posibilităţi: 1. transaminare la aspartat; 2. conversie la glucoză prin calea glicogenică; 3. condensare cu acetil CoA pentru a forma citrat; 4. conversie la piruvat (figura 26). Atomii de C proveniţi din degradarea aminoacizilor sunt utilizaţi la sinteza intermediarilor metabolici majori.

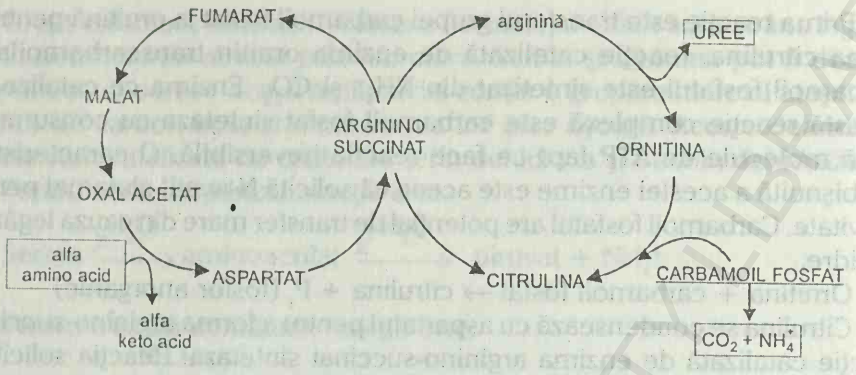


Fig. 26. Legătura dintre ciclul acidului citric, ciclul ureei şi transaminare.

Compartimentarea enzimelor din ciclul ureei. Unii intermediari din ciclu solicită să fie transportaţi prin membrana mitocondrială. Mitocondria conţine două enzime din ciclul ureei: carbamoil fosfat sintetaza şi ornitin transcarbamilaza. În citozol se găsesc trei enzime din ciclul ureei: arginino-succinat sintetaza, arginino-succinat liaza şi arginaza.

Reglarea ciclului ureei. Concentraţia enzimelor din ciclul ureei, variază în funcţie de schimbările survenite în hrană. O dietă lipsită de proteine esenţiale face ca excreţia de uree să fie de aprox. 60% în comparaţie cu o dietă normală. Cu o dietă bogată în proteine sau în stare de inaniţie (când gliconeogeneza pornind de la aminoacizi este mare) concentraţia de enzime din ciclul ureei creşte de mai multe ori peste valoarea normală.

Defectele genetice ale enzimelor din ciclul ureei. Copiii cărora le lipsesc enzime din ciclul ureei, de obicei, nu supravieţuiesc. Pot fi defecte care reduc activitatea unor enzime, dar nu le elimină complet. Iată câteva defecte genetice ce duc la apariţia unor boli: hiperamonemia de tip I datorată defectului în enzima carbamoil fosfat sintetaza; hipoamonemia de tip II se datorează unui defect al enzimei ornitin-transcarbamilaza; citrulinuria datorată unui defect al enzimei argino-succinat sintetaza; arginin succinic acidemia datorată unui defect al enzimei arginin-succinat liaza; hiperargininemia datorată unui defect al arginazei.

Simptomele prezentate de aceste boli pot fi:

a) Un simptom al multor boli produse de defecte enzimatice în ciclul ureei este hiperamonemia, o acumulare de amoniac în sânge, care este mai severă la tipurile I şi II de hiperamonemie. Nivelul crescut de amoniac este toxic şi poate produce leziuni cerebrale.

b) Encefalopatii episodice ca: ataxia şi convulsiile se produc în copilărie datorită unui deficit parţial al enzimelor din ciclul ureei. Aceste encefalopatii încetează după o dietă cu restricţie proteică. Diagnosticul timpuriu este critic pentru prevenirea retardului mental. Concentraţia mare de ioni de amoniu schimbă echilibrul reacţiei catalizate de glutamat dehidrogenază, spre formarea glutamatului. NH_4^+ reacţionează atunci cu glutamatul şi formează glutamina.

Bolnavii cu hiperamonemie au în LCR o concentraţie mare de glutamină care poate duce la deteriorarea celulei cerebrale.

$$\alpha \text{ cetoglutarat} \xrightarrow[\text{glutamat dehidrogenaza}]{+ NH_4^+} \text{glutamat} \xrightarrow[\text{glutamat sintaza}]{+ NH_4^+} \text{glutamina}$$

Soarta scheletului carbonic al aminoacizilor. Am considerat mai înainte reacţiile prin care sunt îndepărtate grupările alfa amino de la aminoacizi şi sunt convertite în uree. Să vedem acum ce se întâmplă cu scheletul carbonic. Strategia degradării aminoacizilor este formarea de intermediari metabolici majori care pot fi convertiţi în glucoză sau pot fi oxidaţi în ciclul acidului citric. De fapt, scheletul carbonic al celor 20 de aminoacizi este convertit în numai 7 molecule: piruvat, acetil CoA, acetoacetil CoA, alfa cetoglutarat, succinil CoA, fumarat şi oxaloacetat, fapt ce dovedeşte remarcabila economie a conversiei metabolice.

Aminoacizii degradaţi la acetil CoA sau acetoacetil CoA sunt denumiţi cetogeni, pentru că duc la creşterea corpilor cetonici. Spre deosebire de aceştia, aminoacizii care sunt degradaţi la piruvat, alfa cetoglutarat, succinil CoA, fumarat sau oxalacetat sunt numiţi glicogenici. Este posibilă sinteza glucozei din aminoacizii glicogenici, deoarece intermediarii din ciclul acidului citric şi piruvatul pot fi convertiţi în fosfoenol piruvat şi apoi în glucoză. Mamiferelor le lipseşte echipamentul enzimatic pentru sinteza glucozei din acetil CoA sau acetoacetil CoA.

– Aminoacizii cetogenici: din setul de 20 de aminoacizi numai leucina şi lizina sunt pur cetogenici.

– Aminoacizii glicogenici: alanina, arginina, asparagina, aspartatul, cisteina, glutamatul, glutamina, glicina, metionina, prolina, serina, treonina şi valina.

– Aminoacizii consideraţi a fi atât cetogenici, cât şi glicogenici sunt: izoleucina, fenilalanina, tirozina şi triptofanul.

Această clasificare nu este universal acceptată, deoarece sunt aplicate diverse criterii (figura 27).

Piruvatul este punctul de intrare pentru aminoacizii: alanină, serină, cisteină, glicină, treonină şi triptofan. Dintre aminoacizii cu 3 atomi de carbon, alanina poate produce direct piruvat prin transaminare.

$$\text{Alanina} + \alpha \text{ cetoglutarat} \rightarrow \boxed{\text{PIRUVAT}} + \text{glutamat}$$

Glutamatul este deaminat oxidativ, produce NH_4^+ şi regenerează alfa cetoglutaratul.

Altă reacţie simplă de degradare a unui aminoacid este deaminarea serinei la piruvat prin serindehidrogenază.

$$\text{Serina} \rightarrow \boxed{\text{PIRUVAT}} + NH_4^+$$

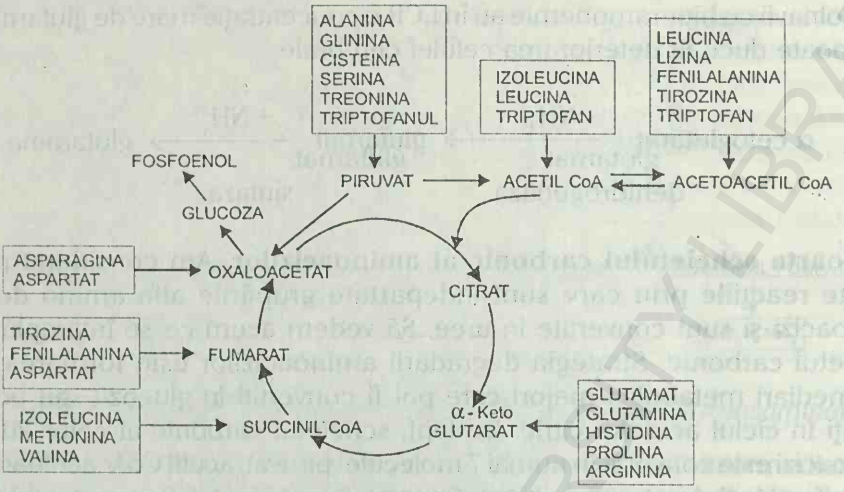


Fig. 27. Soarta scheletului carbonic al aminoacizilor.

Cisteina poate fi convertită în piruvat prin mai multe căi metabolice prin care atomul S este inclus în { H_2S, SO_3^{2-}, SCN^-

Glicina poate fi convertită în serină prin adăugarea pe cale enzimatică a grupei hidroximetil. Treonina (un aminoacid cu 4 atomi de carbon) poate fi transformată în piruvat prin compusul intermediar aminoacetona. Din structura triptofanului, 3 atomi de carbon pot fi găsiţi în alanină care poate fi apoi convertită în piruvat. Aminoacizii cu 4 atomi de carbon, aspartatul şi asparagina sunt convertiţi în oxaloacetat. Aspartatul este convertit direct în oxaloacetat prin transaminare cu α-cetoglutarat.

Aspartat + α cetoglutarat → oxaloacetat + glutamat

Asparagina este convertită de asparaginază în aspartat, care este transformat apoi în oxaloacetat. Aspartatul poate fi de asemenea convertit în fumarat în ciclul ureei. Fumaratul poate fi un punct de intrare pentru o parte din atomii de carbon ai tirozinei şi fenilalaninei.

Aminoacizii cu 5 atomi de carbon. Mulţi aminoacizi din acest grup sunt convertiţi în glutamat care este apoi transformat în alfa-cetoglutarat prin deaminarea oxidativă de către glutamat dehidrogenază. Scheletul carbonic al acestor aminoacizi intră în ciclul acidului citric ca alfa-cetoglutarat. Alfa-cetoglutaratul este punctul de intrare al multor aminoacizi cu 5 atomi de carbon, care sunt convertiţi prima dată la glutamat. Glutamina este convertită la glutamat şi NH_4^+ de către glutaminază. Histidina este convertită la glutamat printr-o serie de reacţii care includ transferul grupării formimina la tetrahidrofolat (un intermediar activat) care duce în ultimă instanţă la formarea glutamatului. Prolina suferă reacţii care implică deschiderea inelului şi conversia la glutamat semialdehidă şi apoi la glutamat. Arginina este convertită de către arginază la ornitină, care este transformată apoi în glutamat.

Punctul de intrare în ciclul acidului citric pentru aminoacizi metionină, izoleucină şi valină este succinil CoA. Calea de la propionil CoA la succinil CoA este foarte interesantă. Propionil CoA este carboxilat cu cheltuirea unui mol de ATP pentru a produce D izomerul metilmalonil CoA. Această reacţie de carboxilare este catalizată de enzima propionil CoA carboxilaza, o biotinenzimă care are un mecanism catalitic asemănător cu cel al acetil CoA carboxilazei şi piruvat carboxilazei. Acest D-izomer al metil malonil CoA este racemizat la L-izomer, care este substratul pentru o enzimă mutaza. Aceasta îl converteşte în succinil CoA.

Propionil CoA → D-metil malonil CoA $\rightleftarrows$ L-metil malonil CoA

Calea metabolică de la propionil CoA la succinil CoA participă de asemenea în oxidarea acizilor graşi care au un număr impar de atomi de C. Clivajul tiolitic final al acizilor graşi cu număr impar de atomi de carbon produce acetil CoA şi propionil CoA. Pe de altă parte, acizii graşi cu număr impar de atomi de carbon sunt parţial glicogenici.

Enzima metil malonil CoA mutaza, enzima care produce izomerizarea L-metil malonil CoA în succinil CoA, este una dintre cele două enzime cunoscute ale mamiferelor ce conţin drept coenzimă derivaţi ai vitaminei B_{12}. Coenzima furnizează B_{12} (cobalamina) furnizează radicali liberi pentru a cataliza migrările intramoleculare care implică hidrogenul. Cobalamin-enzimele catalizează 3 tipuri de reacţii: 1) rearanjări intramoleculare; 2) metilări (ca în sinteza metioninei); 3) reducerea ribonucleotidelor la dezoxiribonucleotide. Conversia L-metil malonil CoA la succinil CoA (o rearanjare moleculară) şi formarea metioninei prin metilarea homocisteinei sunt reacţii cunoscute a fi dependente de coenzima B_{12} la mamifere. Absorbţia cobalaminei se face printr-un sistem de transport specializat. Stomacul secretă o glicoproteină numită factor intrinsec (58 Kd) care leagă cobalamina în lumenul intestinal. Complexul este legat ulterior de un receptor specific din structura ileonului. Complexul cobalamină şi factor intrinsec este apoi disociat de un factor de eliberare şi transportat activ prin membrana iliacă în circuitul sanguin.

Anemia pernicioasă este produsă de deficitul factorului intrinsec, care duce la o deteriorare a absorbţiei cabalaminei şi în consecinţă sinteza de purine şi timină este deteriorată. Această boală este ameliorată prin consumarea unei mari cantităţi de ficat (sursă bogată în cobalamină) aşa încât să fie absorbită o cantitate suficientă de vitamină chiar în absenţa factorului intrinsec sau prin injecţii intramusculare cu cobalamină, lunar.

Un defect al metil malonil CoA mutazei este cunoscut sub numele de acidurie metilmalonică. Acest defect genetic este evident din primul an de viaţă, când cel mai pregnant simptom este acidoza; pH-ul sângelui arterial este aprox. 7,0 în timp ce pH-ul normal este 7,4. La aceşti bolnavi apare în urină o cantitate mare de metil malonat peste 1g/24h (o persoană normală excretă mai puţin de 5 mg metil malonat/24h. Aproximativ jumătate din aceşti bolnavi cu acidurie revin la valori normale în urma administrării intramusculare a vitaminei B_{12}, fapt ce dovedeşte că defectul este în transferaza ce catalizează sinteza de vitamină B_{12}. Spre deosebire de aceştia, alţi bolnavi cu deficit de

metil malonil CoA nu răspund la tratamentul cu doze mari de cobalamină. La unii dintre aceştia, defectul este în apoenzima metil malonil CoA mutazei şi această formă de acidurie metilmalonică este frecvent letală.

Leucina este degradată la acetil CoA şi acetoacetil CoA. Din setul de 20 de aminoacizi, leucina şi lizina sunt aminoacizi pur cetonici. Leucina este transaminată la alfa-cetoacidul corespunzător alfa-cetoizocaproat. Acest alfa-cetoacid este apoi degradat printr-o reacţie alkin, asemănătoare celei produse în ciclul acidului citric şi în oxidarea acizilor graşi. Este o decarboxilare oxidativă cu producere de izovaleril CoA. Această reacţie este analoagă cu decarboxilarea oxidativă a piruvatului la acetil CoA şi a α-cetoglutaratului la succinil CoA.

Leucina → α-cetoizocaproat → izovaleril-CoA

Izovaleril CoA printr-o serie de reacţii de dehidrogenare oxidativă, carboxilare şi hidratare duce la formarea acetil CoA şi acetoacetil CoA.

Este interesant să observăm că multe coenzime participă în degradarea leucinei la acetoacetil-CoA şi acetoacetat: PLP în transaminare, TPP, lipoatul, FAD şi NAD^+ în decarboxilarea oxidativă, FAD din nou în dehidrogenare şi biotina în carboxilare. Coenzima A este transportor de grupare acil în aceste reacţii. Calea degradării valinei şi izoleucinei seamănă cu cea a leucinei. Toţi aceşti trei aminoacizi sunt iniţial transaminaţi la alfa-cetoacizii corespunzători, care apoi sunt decarboxilaţi oxidativ pentru a da un derivat al CoA (figura 28).

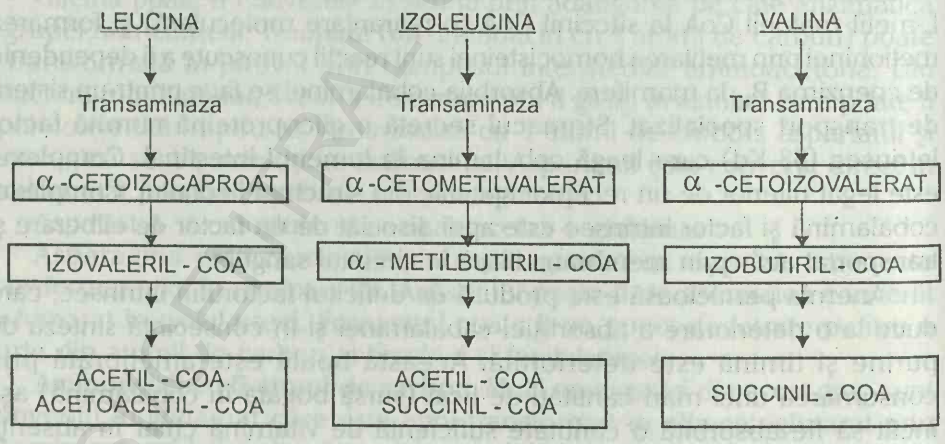


Fig. 28. Degradarea aminoacizilor: leucina, izoleucina şi valina.

Fenilalanina şi tirozina sunt degradate cu ajutorul oxigenazelor la acetoacetat şi fumarat. Reacţia este un exemplu al modului în care molecula de oxigen este folosită pentru a scinda un inel aromat. Prima etapă este hidroxilarea fenilalaninei la tirozină, reacţie catalizată de fenilalanin hidroxilază (enzima se mai numeşte şi monooxigenaza, deoarece un atom de oxigen apare în produs şi altul în apă).

Fenilalanina + O_2 + NADH + H^+ → tirozina + NAD^+ + H_2O

Reducătorul este tetrahidrobiopterina, un transportor de electroni. Etapa următoare este transaminarea tirozinei la p-hidroxifenilpiruvat. Acest alfa-cetoacid reacţionează apoi cu O_2 şi formează homogentizatul. Enzima ce catalizează această reacţie complexă este p-hidroxifenilpiruvat hidroxilaza (numită şi dioxigenaza deoarece ambii atomi de oxigen sunt încorporaţi în produs, unul în inel şi altul în grupul carboxil). Inelul aromatic al homogentizatului este clivat de O_2 şi se formează 4-maleilacetoacetat. Reacţia este catalizată de altă dioxigenază: homogentizat oxidaza. 4-maleilacetoacetatul este apoi izomerizat la 4-fumaril acetoacetat de o enzimă care foloseşte glutationul drept cofactor. În final 4-fumaril acetoacetatul este hidrolizat la fumarat şi acetoacetat.

Enzimele p-hidroxilfenilpiruvat hidrolaza şi homogentizat oxidaza sunt dioxigenaze intramoleculare, deoarece amândoi atomii de O_2 apar în acelaşi produs. Centrul activ al acestor enzime conţine fier care nu face parte din hem sau dintr-un cluster Fe-S. Aproape toate clivările inelelor aromate din sistemele biologice sunt catalizate de dioxigenaze, o clasă de enzime descoperite de Osamu Hayaishi.

Tabelul 7

Defecte ereditare ale catabolismului aminoacizilor

Defectul	Enzima implicată	Aminoacidul
Fenilcetonuria	fenilalanin hidrolaza	PHE
Alcaptonuria	homogentizat oxidaza	PHE, TYR
Tirozinemia tip I	4-fumaril acetat hidrolaza	PHE, TYR
Tirozinemia tip II	tirozin transaminaza	PHE, TYR
Neonatal tirozinemia	4-hidroxifenilpiruvat	PHE, TYR
Metil malonicaciduria	metil malonil CoA mutaza	MET, VAL, ILE
Izovaleric acidemia	izovaleril CoA dehidrogenaza	LEU
Histidinemia	histidinamonioliaza	HIS
Hiperprolinemia	prolin oxidaza	PRO

4.1.5. Recirculaţia proteică

Scindarea proteinei până la aminoacizii liberi este cunoscută sub denumirea de proteoliză. Calea metabolică prin care aminoacizii sunt degradaţi până la amoniac şi dioxid de carbon (CO_2) constituie catabolismul aminoacizilor. Pentru a simplifica prezentările fondului comun al aminoacizilor din organism se foloseşte o noţiune abstractă: rezervor de aminoacizi (*pool* de aminoacizi).

Rezervorul de aminoacizi are mai multe compartimente care sunt diferite atât în compoziţia, cât şi în concentraţia de aminoacizi. În compartimentul intracelular, concentraţia de aminoacizi este mult mai mare decât în cel extracelular şi gradientul este menţinut prin transportul activ de aminoacizi în celule. Mărimea gradientului variază cu diferiţi aminoacizi, fiind mai mare pentru glutamat şi glutamină. De asemenea concentraţia de aminoacizi din compartimentul intracelular este diferită de la un ţesut la altul (figura 29).

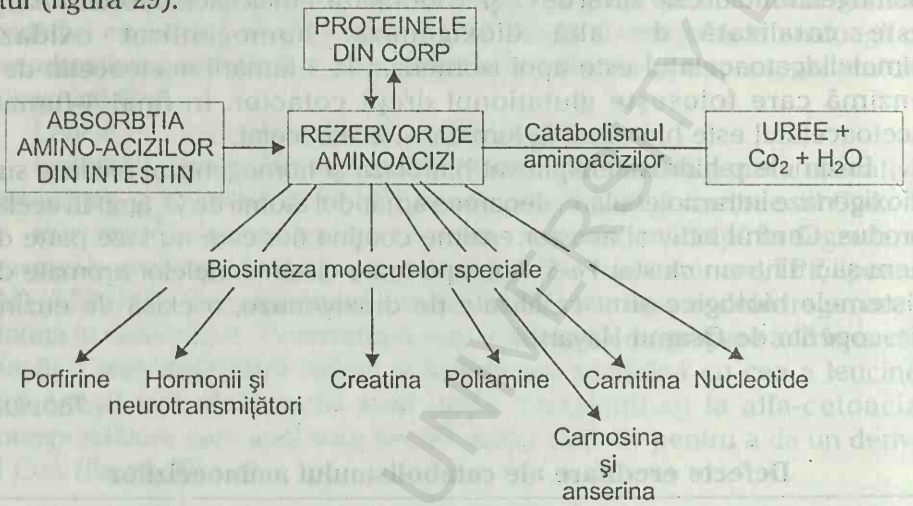


Fig. 29. Căile majore ale aminoacizilor.

Căile metabolice majore ale aminoacizilor. Cantitatea totală de aminoacizi liberi din organism este de aproximativ 100 g, din care 50% este dată de glutamat şi glutamină şi aproximativ 10% este reprezentată de aminoacizii esenţiali (în timpul creşterii, copilul nu poate sintetiza în întregime cantitatea de arginină necesară pentru acoperirea nevoilor cerute de sinteza de proteine şi formarea de uree şi în aceste circumstanţe arginina poate fi considerată ca un aminoacid esenţial).

Intrarea aminoacizilor în *pool* se face prin: a) dieta proteică; b) proteoliza proteinelor celulare.

Ieşirea aminoacizilor din *pool* se face prin: a) sinteza de proteine, care este scopul major al aminoacizilor; b) catabolismul aminoacizilor.

Conţinutul proteic al corpului. Aproximativ jumătate din proteina endogenă este asociată cu scheletul şi cu alte ţesuturi de suport. Componenta majoră a acestor ţesuturi este colagenul care se elimină foarte încet (are un turnover foarte lent).

Proteinele plasmatice reprezintă o parte mică, dar vitală a proteinelor endogene şi au un turnover rapid. Timpul de înjumătăţire normal pentru albumina plasmatică este de 20 de zile.

Altă jumătate din proteinele corpului sunt intracelulare. Aceste proteine sunt mult mai dinamice, continuă sinteza de proteine şi le înlocuiesc pe cele degenerate.

I. **Intrările în rezervorul de aminoacizi** se face prin:
1. calea gastrointestinală;
2. proteoliza şi proteinele endogene.

1. **Calea gastrointestinală.** Aproximativ 70-100 g din dieta proteică zilnică şi 35-100 g din proteina endogenă sunt digerate şi absorbite zilnic. Polipeptidele nu sunt absorbite ca atare, cu excepţia unei perioade scurte neonatale, dar pot fi hidrolizate în aminoacizi liberi. Proteoliza este îndeplinită de enzime proteolitice, care se găsesc în sucul intestinal, sucul pancreatic şi pe suprafaţa celulelor intestinale.

Tabelul 8

Enzimele proteolitice şi proprietăţile lor

Enzima	Sediul acţiunii	pH optim	Substrat specific
PEPSINA	stomac	1,5-2,5	reziduurile multor aminoacizi
TRIPSINA	intestin	7,5-8,5	reziduuri de arginină şi lizină
CHIMOTRIPSINA	intestin	7,5-8,5	reziduuri de amino-acizi aromaţi
ELASTAZA	intestin	7,5-8,5	reziduuri mici de aminoacizi nepolari
AMINOPEPTIDAZA	mucoasa intestinală	7,5-8,5	reziduuri de amino-acizi capătul N-terminal
CARBOXIPEPTIDAZA	intestin	7,5-8,5	reziduuri de amino-acizi capătul C-terminal

a. *Sucul gastric.* HCl (pH 2) din sucul gastric ucide microorganismele, denaturează proteinele şi formează un mediu acid pentru acţiunea pepsinei. Pepsina, enzimă proteolitică, acţionează la pH acid. Ea este secretată în stomac ca proenzimă (pepsinogen). Pepsinogenul este activat prin îndepărtarea a 44 de aminoacizi N-terminali, de către concentraţia mare de ioni de H (autocataliza pepsinei sau autoactivarea). În urma hidrolizei peptidice a proteinelor rezultă peptide mari şi unii aminoacizi liberi. Peptidele eliberate acţionează ca stimulatori pentru secreţia colecistochininei în duoden şi astfel se creează condiţii pentru proteoliza pancreatică.

b. *Sucul pancreatic.* Endopeptidazele şi carboxipeptidazele din sucul pancreatic sunt secretate ca proenzime de către celulele acinilor pancreatici sub influenţa secretinei şi colecistochinin-pancreoziminei. Activarea proenzimei se produce sub acţiunea enteropeptidazei (enterokinaza) secretată de celulele epiteliului duodenal. Enteropeptidaza activează tripsinogenul prin clivarea a 6 aminoacizi. Tripsina activată, activează la

rândul ei mai mult tripsinogen. Tripsina activează de asemenea proenzimele următoarelor enzime: endopeptidaza, chimotripsina, elastaza şi carboxipeptidazele A şi B (figura 30).

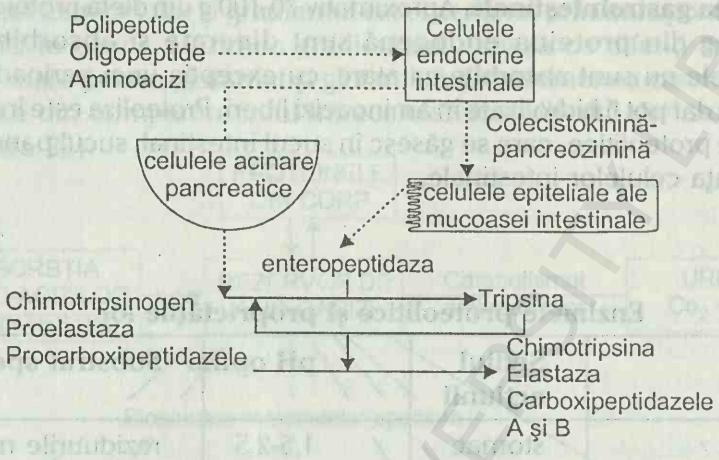


Fig. 30. Secreţia şi activarea enzimelor pancreatice.

c. *Proteazele intestinale.* Aminopeptidazele şi dipeptidazele de pe suprafaţa celulelor intestinale continuă digestia proteinei la aminoacizi liberi. Dipeptidele şi tripeptidele sunt absorbite ca atare şi sunt digerate până la aminoacizi liberi în celulele epiteliale ale intestinului. Absorbţia are loc în intestinul subţire. Au fost identificate 5 sisteme separate pentru transportul aminoacizilor de la lumenul intestinului în celulele epiteliului intestinal. Defectele asociate cu transportul aminoacizilor, duc la creşterea cantităţii de aminoacizi în urină (aminoaciduria). În multe cazuri aceste tulburări sunt benigne sau produc numai tulburări minore deoarece aminoacizii sunt absorbiţi din intestin şi sub forma de peptide, prin sisteme de transport separate.

Cistinuria se produce datorită unui defect al sistemului de transport al aminoacizilor bazici, sistem care transportă de asemenea şi cisteina. Absorbţia acestui aminoacid este diminuată în intestin şi tubii renali.

Glicinuria (iminoglicinuria) se datorează unui defect în transportul iminoacizilor prolina, hidroxiprolina şi glicina, a căror absorbţie este diminuată în tubii renali.

Boala Hartnup este produsă de un defect al sistemului de transport al aminoacizilor neutri şi aromatici. Absorbţia acestor aminoacizi este diminuată în intestin şi tubii renali.

2. **Proteoliza şi proteinele endogene.** Proteinele corpului sunt scindate continuu la aminoacizi liberi. Viteza degradării proteinelor individuale variază foarte mult. Unele enzime hepatice au un timp de înjumătăţire de numai câteva ore, în timp ce hemoglobina şi hematiile au un timp de înjumătăţire de 120 de zile iar unele proteine structurale (colagenul) au timp de înjumătăţire foarte lung.

Factorii care afectează rata degradării proteinelor sunt: a) denaturarea proteinei (ex: pierderea configuraţiei native optime) accelerează rata proteolitică; b) activarea lizozomilor creşte rata proteolizei intracelulare; c) glucocorticoizii cresc degradarea proteinei în ţesutul muscular; d) hormonul tiroidian în exces creşte *turnover*-ul proteic; e) insulina reduce proteoliza şi creşte sinteza de proteine.

II. **Ieşirea aminoacizilor din pool** se face prin:

1. Sinteza de proteine. Aminoacizii sunt folosiţi ca substrat pentru sinteza proteinelor.

2. Catabolismul aminoacizilor la uree şi CO_2 este în permanenţă corelat cu rezervorul de aminoacizi. În starea de înfometare, degradarea aminoacizilor este redusă, dar nu este oprită niciodată. Trebuie să fie o intrare zilnică de aminoacizi esenţiali pentru a-i înlocui pe cei pierduţi din rezerva corpului.

Balanţa de azot. Dacă pierderea zilnică de azot prin urină, piele şi fecale este egală cu ingerarea zilnică de azot, putem spune că balanţa azotului unui adult sănătos este adecvată.

Căile pierderii azotului sunt: excreţia de urină reprezintă aproximativ 90% din azotul pierdut din corp, în funcţie de azotul ingerat; pierdere de azot se produce de asemenea prin piele în special ca sudoare şi o cantitate mică prin materiile fecale (un om cu greutatea de 70 Kg pierde aproximativ 2 g azot zilnic prin piele şi fecale).

O balanţă de azot este pozitivă dacă pierderile de azot sunt mai mici decât aportul. Balanţa de azot este negativă dacă pierderea de azot este mai mare decât aportul, ca în bolile ce implică distrugeri de ţesut sau înfometare. Perioada prelungită de balanţă de azot negativă este periculoasă şi fatală dacă pierderea proteinelor organismului ajunge la 1/3 din proteina totală.

4.1.6. Metabolismul intermediar al proteinelor. Informaţia genetică

Există mai multe „secrete cheie ale vieţii", de care depinde capacitatea unei celule de a creşte şi a se divide.

În primul rând este vorba de necesitatea existenţei unei membrane de înveliş cu un grad de organizare mare, capabilă printr-o permeabilitate selectivă să menţină concentraţia ridicată a moleculelor din mediul interior. În al doilea rând trebuie să existe enzime care să catalizeze trecerea atomilor din moleculele substanţelor nutritive în elemente noi de construcţie ale celulei. În al treilea rând este necesar ca celula să-şi procure din moleculele substanţelor nutritive (sau de la soare în cazul plantelor) o formă utilizabilă de energie, care să asigure echilibrele termodinamice care favorizează mai mult reacţiile de sinteză decât pe cele de desfacere. Aceste

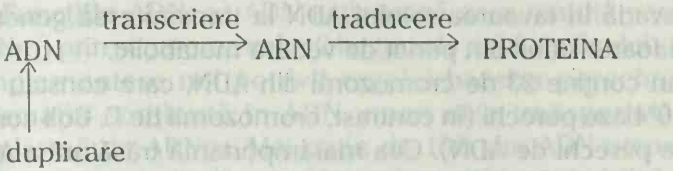
proprietăţi sunt strâns legate de existenţa proteinelor. Numai aceste molecule foarte mari, alcătuite din 20 de „pietre de construcţie diferite" (care sunt aminoacizii) posedă specificitate suficientă pentru a edifica membrane cu permeabilitate selectivă sau a cataliza transformări chimice înalt specifice.

De asemenea trebuie să mai adăugăm şi capacitatea de a sintetiza cantităţile fiziologice necesare de proteine specifice.

Ipoteza existenţei unei relaţii directe între gene şi enzime a fost emisă încă din anul 1909 pe baza unui studiu asupra metabolismului fenilalaninei, la pacienţii ce sufereau de anumite boli ereditare, dar abia după 1941, când cercetătorii au reuşit să izoleze la Neurospora şi la E. Coli o serie de mutanţi dependenţi de diverşi factori de creştere, ipoteza „o genă - o enzimă" a devenit certitudine. Una dintre primele dovezi aduse în acest sens a fost studiul biosintezei argininei. Calea sa metabolică porneşte de la acidul glutamic şi parcurge opt reacţii chimice, fiecare dintre ele catalizate de o enzimă diferită. Pentru fiecare etapă au fost izolaţi mutanţi incapabili să execute reacţia enzimatică respectivă. Aceasta sugerează faptul că prezenţa fiecărei enzime este controlată de o genă separată. Enzimele nu sunt singurele proteine controlate în mod direct de către gene. Orice proteină este specificată de o genă, rezervată exclusiv acelei proteine. O dovadă certă au constituit-o studiile asupra hemoglobinei întâlnită la persoanele cu anemie falciformă (cu hematii în formă de seceră). Aceasta este o boală a cărei bază genetică a fost bine lămurită şi constă în înlocuirea unui singur aminoacid. Dacă gena S (de la *sickle* = seceră) este prezentă în ambii cromozomi omologi, atunci apare o anemie severă, caracterizată prin aceea că globulele roşii au o formă de seceră. Dacă există numai o singură genă S, dar alela din cromozomul omolog este normală (+), anemia se manifestă mai puţin sever şi globulele roşii au o formă relativ normală. Mai mult, astăzi se ştie că formularea mai corectă este „o genă – un lanţ polipeptidic". Atunci când o proteină conţine mai multe lanţuri polipeptidice, fiecare lanţ este produs separat. După ce aceste lanţuri au fost sintetizate, ele se agregă pentru a forma proteina finală. În general cele două sau mai multe lanţuri polipeptidice necesare pentru a construi o proteină funcţională sunt controlate de gene învecinate. Lucrurile nu stau întotdeauna astfel. Lanţurile alfa şi beta ale hemoglobinei nu sunt controlate de gene legate între ele. Testul de complementare nu ne spune dacă două gene controlează proteine diferite, ci mai exact dacă ele controlează două lanţuri polipeptidice diferite. Informaţia care specifică secvenţa de aminoacizi din proteină este înmagazinată în polimeri cu lanţ lung, acizii dezoxiribonucleici (ADN). Genele specifică felurile de proteine care vor fi sintetizate de celulă. Totuşi ADN însuşi nu serveşte în mod direct de matriţă pentru ordonarea secvenţelor de aminoacizi. Aceste matriţe sunt moleculele de acid ribonucleic (ARN) – polimer mare, foarte asemănător din punct de vedere chimic cu ADN.

ARN mesager (ARNm), o clasă de molecule de ARN, este purtătorul intermediar de informaţie în sinteza de proteine. Alte molecule de ARN, ca ARN de transfer (ARNt) şi ARN ribozomal (ARNr) sunt părţi ale „maşinăriei" care sintetizează proteine.

Poziţia lor în raport cu ADN şi cu proteinele este exprimată de obicei în mod sintetic prin următoarea schemă denumită adeseori „dogma centrală":



Săgeţile indică sensul în care este transferată informaţia genetică. Săgeata îndreptată spre ADN semnifică faptul că el însuşi constituie matriţa pentru propria lui replicare. Faptul că ARN se prezintă ca şi ADN sub forma unui lanţ lung neramificat, ale cărui verigi sunt formate din patru nucleotide diferite, ne sugerează că informaţia genetică din lanţurile de ADN este transferată unei secvenţe complementare de ribonucleotide. Conform acestei ipoteze în cursul uneia sau mai multor etape din ciclul celular, lanţurile de ADN se separă şi funcţionează ca matriţe înspre care sunt atrase ribonucleotidele complementare printr-un mecanism de împerechere a bazelor; adenina (A) cu timina (T) sau uracilul (U) şi guanina (G) cu citozina (C). Un mecanism de control dictează când anume lanţurile de ADN care s-au separat vor funcţiona ca matriţe pentru un lanţ complementar de ADN sau pentru unul de ARN. Dovezi în sprijinul acestei ipoteze au fost favorizate de descoperirea enzimei ARN-polimeraza, care există practic în toate celulele. Această enzimă cuplează ribonucleotidele între ele, catalizând formarea legăturilor internucleotidice 3'-5' fosfodiesterice. Enzima îndeplineşte această acţiune numai în prezenţa ADN, ceea ce sugerează faptul că pentru ca ARN-polimeraza să-şi poată îndeplini misiunea, ADN trebuie să asigure alinierea precursorilor nucleotidici în ordinea corectă. ARN polimerazele primesc instrucţiuni de la matriţele de ADN. Procesul de transcripţie este urmat de traducerea informaţiei şi de sinteză a proteinelor, conform instrucţiunilor primite de matriţa ARNm. Aceasta ne lămureşte codul genetic, relaţia dintre secvenţa de baze în ADN (sau transcripţia lor în ARNm) şi secvenţa de aminoacizi din proteine.

Codul genetic este aproape acelaşi în toate organismele şi este uimitor de simplu. O secvenţă de trei baze, numită codon, specifică un aminoacid. Codonii din ARNm sunt citiţi secvenţial de moleculele de ARNt, care servesc ca adaptori în sinteza de proteine.

Sinteza de proteine are loc pe ribozomi, care sunt subansambluri de complexe de rARNs şi a peste cincizeci de proteine felurite. Proteina nou sintetizată conţine semnale care o fac aptă să îndeplinească diferite funcţii. O altă caracteristică este structura mozaicată a genei, care este alcătuită din introni şi exoni, fapt ce are implicaţii profunde pentru evoluţie.

Structura şi funcţia genei. Gena este aproape întotdeauna ADN. Rolul genetic al ADN a fost arătat încă din 1943 de Auvery şi colaboratorii săi. S-a constatat că ADN este localizat aproape exclusiv în nucleu şi nu poate fi

detectat practic niciodată în absenţa cromozomilor. Mai mult, cantitatea de ADN dintr-o garnitură cromozomică diploidă este constantă pentru fiecare organism dat şi este egală cu dublul cantităţii prezente în spermatozoizii haploizi. O altă dovadă în favoarea rolului ADN la transmiterea genetică este aceea că este foarte stabil din punct de vedere metabolic.

Genomul uman conţine 23 de cromozomi din ADN, care constau din aproximativ $3,6 \times 10^9$ baze perechi (în contrast, cromozomii de E. Coli conţin numai 4×10^6 baze perechi de ADN). Cea mai importantă trăsătură a ADN este aceea că în mod obişnuit el se compune din două lanţuri polimere subţiri şi foarte lungi, răsucite unul în jurul celuilalt sub forma unor structuri dublu elicoidale regulate. Fiecare lanţ este un polinucleotid, o înşiruire polimeră regulată de nucleotide în care zahărul fiecărui nucleotid (dezoxiriboza) este legat printr-o grupare fosfat de zahărul nucleotidului vecin.

Sunt patru nucleotide principale, fiecare dintre ele conţinând un rest de dezoxiriboză, o grupare fosfatică şi o bază purinică sau pirimidinică (bazele purinice din ADN sunt adenina (A) şi guanina (G), iar bazele pirimidinice timina (T) şi citozina (C)).

În lanţul polinucleotidelor, unirea zahărului cu grupările fosfatice interesează întotdeauna aceiaşi radicali chimici, de aceea această parte a moleculei denumită schelet sau „coloană vertebrală" este foarte regulată. În contrast cu aceasta, succesiunea resturilor purinice şi pirimidinice de-a lungul lanţului este foarte neregulată şi variază de la o moleculă la alta. Cele două lanţuri sunt unite între ele prin punţi de hidrogen între perechile de baze. Adenina face întotdeauna pereche cu timina, iar guanina cu citozina, acestea fiind singurele aranjamente posibile. Stricteţea acestor reguli de împerechere au ca rezultat o relaţie complementară între secvenţele bazelor celor două lanţuri răsucite unul în jurul celuilalt. De exemplu, dacă pe unul dintre lanţuri există o secvenţă GATCT, lanţul opus va trebui să aibă secvenţa CTAGA. O consecinţă stereo-chimică a formării perechilor de baze T....A şi C....G este aceea că secvenţele bazelor din cele două lanţuri polinucleotide se desfăşoară în direcţii opuse. Un aspect chimic important al acestor structuri este poziţia bine precizată a atomilor de hidrogen în bazele purinice şi pirimidinice, deplasările tautomere de la atom de azot sau oxigen al unui inel la altul fiind foarte rare.

Atomii de N legaţi de un inel purinic sau pirimidinic se află în general în forma amino (NH_2) şi numai foarte rar iau configuraţia imino (NH). În mod analog atomii de oxigen legaţi de C_6 ai guaninei şi timinei au în mod normal forma ceto (C=0) şi numai rareori iau configuraţia enolică (C-OH). Aceste particularităţi de structură au importanţă esenţială pentru funcţiile biologie ale ADN. Capetele lanţurilor de ADN sunt desemnate 5' şi 3'. Prin convenţie capătul 5' al unei secvenţe este scris la stânga şi indică secvenţele apropiate de la începutul genei; capătul 3' este scris la dreapta şi indică secvenţele apropiate de capătul de sfârşit al genei. Noul ADN este sintetizat în direcţia 5' → 3'. Între ADN şi ARN sunt două diferenţe:

1. riboza este glucidul de structură;

2. ARN are baze pirimidinice uracil (U) în loc de tiamină ca în ADN, aşa încât bazele pereche corelate sunt GC şi AU.

Funcţiile ADN: a) ADN acţionează ca o matriţă pentru ARN mesager (ARNm) prin separarea celor 2 lanţuri ale dublu helixului şi sinteza a 2 lanţuri complementare noi potrivit regulei bazelor pereche; b) Transcripţia. Informaţia conţinută în ADN uman este transportată de la nucleu la citoplasmă de ARNm. Mai puţin de 10% din ADN uman este transcris în ARNm, care este tradus apoi în aminoacizi („cărămizile" de construcţie ale proteinelor); c) Traducerea este un proces care se produce în ribozomi unde informaţia codată de ARNm este tradusă într-un lanţ special de aminoacizi. Aminoacizii constituie un peptid. Prima şi a doua bază din tripleta de ARNm sunt fixe în ceea ce priveşte aminoacizii specifici, dar baza din poziţia a treia este mai puţin specifică. De ex: tripleta ARNm care codează pentru arginină poate fi CGU, CGC, CGA sau CGG. Toţi aminoacizii sunt codaţi pentru trei baze pereche, de aceea numărul de baze pereche dintr-o genă este de trei ori numărul de aminoacizi din lanţul peptidic.

Organizarea genei (figura 31). *Exonii* sunt partea funcţională a genei care codează pentru proteină. *Intronii* sunt secvenţele de ADN care întrerup

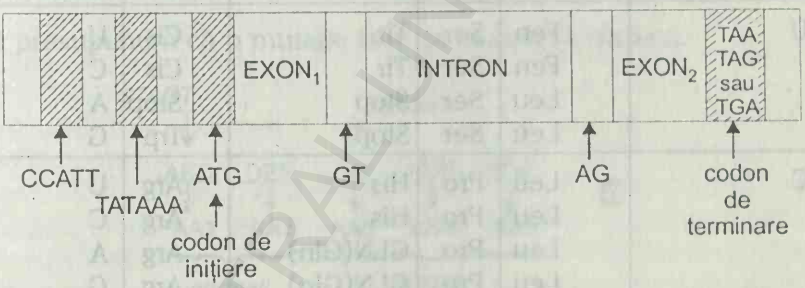


Fig. 31. Principiul structural al unei gene.

multe gene animale, nu codează şi a căror funcţie nu este încă bine cunoscută. Numărul şi locul intronilor variază în diferite gene. În unele cazuri numărul şi localizarea intronilor poate fi un criteriu de determinare a înrudirii genelor specifice.

Limita dintre exoni şi introni nu este o secvenţă întâmplătoare de baze. În multe cazuri primele două baze la capătul 5' al fiecărui intron sunt GT şi ultimele două baze ale fiecărui intron sunt AG.

Cadrul de citire este deschis cu secvenţa care începe cu tripleta ATG-codonul iniţial de traducere universal, care specifică iniţierea sintezei de proteine. Reziduurile ATG sunt la capătul 5' al genei.

Casetele TATAAA la capătul 5' (stânga) al cadrului de citire deschis (ATG) sunt regiuni bogate în AT şi se consideră că ajută direct enzime importante să corecteze iniţierea centrului de traducere. Casetele CCAAT sunt secvenţe produse din 70-90 de perechi de baze situate înaintea punctului de început (ATG) şi sunt considerate a fi importante în reglarea traducerii.

Codonul de terminare: sfârşitul traducerii este indicat de o tripletă terminală de la capătul 3' al genei. Tripleta poate fi TAA, TAG sau TGA.

Transcripţia este procesul prin care se sintetizează un lanţ de mARN cu aceeaşi secvenţă cu a lanţului original (lanţul care codează) al ADN. Traducerea este procesul prin care ribozomii convertesc informaţia purtată de ARN mesager (ARNm) într-o proteină nouă.

Codul genetic este legătura dintre secvenţa de baze din ADN (sau ARN transcris) şi secvenţa de aminoacizi din proteină. Codul genetic este sub formă de codoni. Codonul este o grupă de trei baze adiacente care specifică aminoacizii proteinelor. Deoarece ARNms este compus din 4 baze: adenina (A), uracil (U), guanina (G) şi citozina (C) şi fiecare codon are 3 baze, sunt 4^3 sau 64 secvenţe de codon posibile. Raportul dintre codon şi aminoacid a fost descifrat cu ajutorul copolimerilor sintetici pentru 61 din cei 64 de codoni posibili. Restul de 3 codoni specifică terminarea lanţului (codonii UAA, UAG şi UGA sunt stop codoni).

Tabelul 9

Structura codonilor

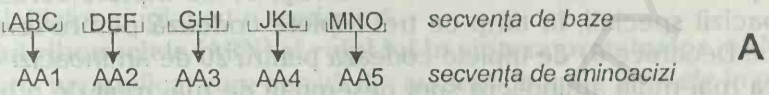
poziţia întâi (5')	poziţia a doua			poziţia a treia (3')	
	U	C	A	G	
U	Fen	Ser	Tir	Cis	U
	Fen	Ser	Tir	Cis	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	GLN(Gln)	Arg	A
	Leu	Pro	GLN(Gln)	Arg	G
A	Ile	Tre	Asp	Ser	U
	Ile	Tre	Asp	Ser	C
	Ile	Tre	Lis	Arg	A
	Met	Tre	Lis	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gli	U
	Val	Ala	Asp	Gli	C
	Val	Ala	Glu	Gli	A
	Val	Ala	Glu	Gli	G

Pentru a găsi codonul unui aminoacid dat, este necesar să citim prima bază pentru aminoacid (coloana din stânga), apoi a doua bază (coloana din mijloc) şi în sfârşit a treia bază (coloana din dreapta). Codonii se referă la direcţia 5' → 3'. Codonul numit stop indică ARN polimerazei că aici se sfârşeşte mesajul.

În anul 1961, prin experienţele lui Francis Crick, Sidney Brenner şi alţii au fost stabilite următoarele trăsături ale codului:

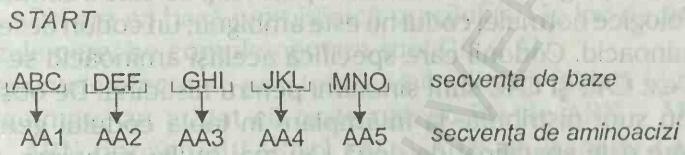
– Codonii nu se suprapun. În cadrul tripletelor care nu se suprapun, fiecare grup de trei baze dintr-o secvenţă ABCDEF specifică numai un aminoacid (ABC specifică pe primul aminoacid) şi DEF pe al doilea etc., în timp ce într-un cod în care tripletele se suprapun, ABC specifică primul aminoacid, BCD pe al doilea, CDE pe al treilea şi aşa mai departe.

Studii efectuate pe aminoacizii mutanţi din virusul mozaicului tutunului şi pe hemoglobina anormală au arătat că este alterat un singur aminoacid, deci codul genetic nu se suprapune.



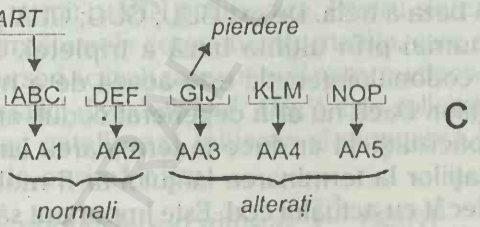
A

– Grupul de 3 baze este citit secvenţial de la un punct de plecare fix, fără virgulă.



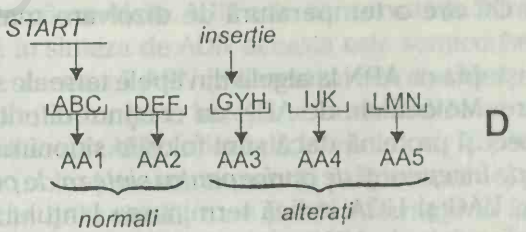
B

Să presupunem că o mutaţie face ca baza H să dispară.



C

Primii doi aminoacizi din lanţul peptidic rezultat sunt normali, dar restul de secvenţe de bază vor fi citite incorect, deoarece cadrul de citire a fost schimbat prin pierderea bazei H. Să presupunem că o bază Y a fost adăugată între bazele G şi H.



D

Această inserţie perturbă de asemenea cadrul de citire al codonului pentru AA_3, AA_4 şi AA_5. De fapt studiile genetice ale adiţiei sau deleţiei mutantelor arată multe trăsături ale cadrului genetic.

Cum am menţionat mai sus, sunt 64 de triplete de baze posibile şi 20 de aminoacizi. Este câte o tripletă pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi sau unii aminoacizi sunt codaţi de mai mult de o tripletă? Studii biochimice au demonstrat că 61 din cele 64 de triplete specifică aminoacizii; atunci pentru mulţi aminoacizi este mai mult decât un codon, cu alte cuvinte codul genetic este degenerat.

Trăsăturile esenţiale ale codului genetic.

Toţi cei 64 de codoni au fost descifraţi; 61 de triplete corespund la aminoacizii speciali, în timp ce trei triplete codează pentru terminarea lanţului. Deoarece 61 de triplete codează pentru 20 de aminoacizi este evident că mai mulţi aminoacizi sunt desemnaţi de mai mult de o tripletă şi codul este înalt degenerat. Numai triptofanul şi metionina sunt codaţi numai de o tripletă. Alţi 18 aminoacizi sunt codaţi de două sau mai multe triplete. Într-adevăr leucina, arginina şi serina sunt specificaţi de câte 6 coduri fiecare. În condiţii fiziologice normale, codul nu este ambiguu; un codon desemnează numai un aminoacid. Codonii care specifică acelaşi aminoacid se numesc sinonimi. De ex: CAU şi CAC sunt sinonimi pentru histidină. De observat că sinonimele nu sunt distribuite la întâmplare în tabla codului genetic. Un aminoacid care este specificat de două sau mai multe sinonime, ocupă o singură casetă (afară de cazul când sunt mai mult de 4 sinonime). Aminoacizii din casetă sunt specificaţi de triplete care au primele 2 baze aceleaşi, dar diferă baza a treia. De ex: GUU; GUG; GUA şi GUG. Deci multe sinonime diferă numai prin ultima bază a tripletei. Semnificaţia unei degenerări mari a codonului genetic este aceea de a minimaliza efectele negative ale mutaţiilor. Dacă nu ar fi degenerat codul, atunci 20 de codoni ar desemna aminoacizii şi 44 ar duce la terminarea lanţului polipeptidic. Probabilitatea mutaţiilor la terminarea lanţului ar fi mult mai mare cu un cod nedegenerat decât cu actualul cod. Este important să amintim faptul că mutaţiile duc de obicei la proteine inactive, în timp ce substituţiile unui aminoacid de regulă nu dăunează. Degenerarea codului permite compoziţiei de baze din ADN să varieze în mare măsură fără ca să altereze secvenţa de aminoacizi a proteinei codate de ADN. Conţinutul în [G] + [C] din ADN la bacterii este cuprins între aprox. 30% până la mai mult de 70%. Molecula de ADN bogată în GC are o temperatură de dizolvare mai mare decât cele bogate în AT.

Ne putem aştepta ca ADN la algele din apele termale să aibă un conţinut de GC mai mare. Moleculele de ADN cu conţinut diferit de [G] + [C] pot coda pentru aceeaşi proteină dacă sunt folosite sinonime diferite.

Semnalele de începere şi de oprire pentru sinteza de proteine. Cum a fost menţionat UAA, UAG şi UGA indică terminarea lanţului. Aceşti codoni nu sunt citiţi de moleculele de ARNt, ci de proteine numite factori de eliberare. Semnalul de începere pentru sinteza de proteine este mai complex.

Lanţurile polipeptidice din bacterii încep cu un aminoacid modificat numit formilmetionină (f.Met). Un ARNt specific ARNt iniţiator transportă f.Met. Acest f.Met – ARNt recunoaşte codonul AUG sau mai puţin frecvent

GUG. Cu toate acestea, AUG este de asemenea codonul pentru metionina internă şi GUG este codonul pentru valina internă. Deci semnalul pentru primul aminoacid în lanţul peptidic trebuie să fie mai complex decât pentru toate celelalte peptide ce urmează: AUG sau GUG fac parte din semnalul de iniţiere. La bacterii semnalul de iniţiere AUG (sau GUG) este precedat de mai multe nucleotide depărtate de o secvenţă bogată în purine, care face pereche de baze cu o secvenţă complementară din molecula ARN ribozomal. La eucariote secvenţa AUG apropiată de capătul 5' al ARNm este de obicei semnalul de strat pentru sinteza de proteine. Acest AUG special este citit de un ARNt iniţiator, cuplat cu o metionină.

Acidul ribonucleic (ARN) şi rolul lui în sinteza proteinelor. ARN este un lanţ lung neramificat care constă din nucleotide unite între ele în poziţia 3'→ 5' prin legături fosfodiesterice (ARN este monocatenar). Cum indică şi numele, glucidul din structura acidului ribonucleic este riboza, fapt ce îl deosebeşte de ADN în care glucidul este dezoxiriboza. Altă deosebire este faptul că ARN are ca bază pirimidinică uracilul (U) în loc de timina (T) aşa încât bazele pereche complementare sunt GC şi AU.

Experienţele efectuate prin tehnica hibridizării, iniţiată în anul 1961 de Sol Spiegelman, au arătat că toate categoriile de ARN – ARN mesager (ARNm), ARN ribozomal (ARNr) cât şi ARN de transfer (ARNt) – sunt sintetizate pe matriţa de ADN.

În anul 1960, Jerard Harwitz şi Samuel Weiss au descoperit independent o enzimă pe care au numit-o ARN polimeraza. Pentru sinteza de ARN, enzima din E. Coli solicită următoarele componente: matriţa, care este ADN dublu sau monocatenar; precursori activaţi care sunt cei patru nucleotid-trifosfaţi ATP, GTP, UTP şi CTP; ioni metalici divalenţi: Mg^{2+} (Mg^{2+} este solicitat şi in *vivo*).

ARN polimeraza catalizează iniţierea şi elongarea lanţurilor de ARN. Reacţia catalizată de enzimă este:

$$(ARN)_{\text{n reziduuri}} + \text{ribonucleozid trifosfat} \overset{\rightarrow}{\leftarrow} (ARN)_{\text{n+1 reziduuri}} + PP_i$$

Sinteza de ARN după matriţa de ADN prezintă multe asemănări cu procesul de duplicare a ADN: a) direcţia de sinteză este 5' → 3'; b) mecanismul de elongaţie este similar; c) sinteza este condusă mai departe prin hidroliza pirofosfatului.

În contrast cu ADN polimeraza, ARN polimeraza nu solicită un primer. Altă diferenţă este aceea că matricea ADN este conservată în întregime în sinteza de ARN, în timp ce în sinteza de ADN aceasta este semiconservată. În sfârşit, altă deosebire este aceea că ARN polimeraza este lipsită de capacitatea pe care o are ADN polimeraza de a îndepărta nucleotidele ce nu se potrivesc. Numărul de nucleotide din ARN variază de la minimum 75 până la câteva mii.

Deşi ARN este un lanţ monocatenar de polinucleotide, prezintă regiuni cu o structură dublu helicoidală, care produc formaţii în formă de „ac de păr" (figura 32).

În această regiune, A face pereche cu U şi G cu C, dar împerecherea bazelor în regiunea „ac" a ARN este frecvent imperfectă. G poate forma bază pereche şi cu U, dar legătura este mai slabă decât cea din GC. Proporţia

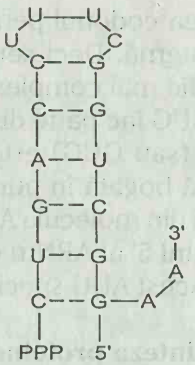


Fig. 32. Regiunea dublu helicoidală a moleculei de ARN.

de regiuni helicoidale în diferitele feluri de ARN variază foarte mult şi în linii mari este de aproximativ 50%.

Celulele conţin mai multe feluri de ARN:

– ARN mesager (ARNm) este matriţa pentru sinteza de proteină. O moleculă de ARNm este produsă pentru fiecare genă sau grupe de gene care vor fi exprimate; de aceea ARNm este o clasă de molecule foarte heterogenă.

– ARN de transfer (ARNt) transportă aminoacizii într-o formă activată la ribozomi, pentru formarea legăturii peptidice într-o secvenţă determinată de matriţa de ARNm. Este cel puţin un fel de ARNt pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi. ARNt constă din aproximativ 75 de nucleotide (cu o masă de aprox. 25 Kd) şi sunt cele mai mici molecule de ARN.

– ARN ribozomal (ARNr) este componentul major al ribozomilor, dar rolul precis nu este încă bine cunoscut. La E. Coli au fost găsite trei feluri de ARNr numite ARN 23 S, 16 S şi 5 S, după constanta de sedimentare. Câte o moleculă din fiecare specie este prezentă în fiecare ribozom.

Dintre cele trei tipuri de ARN, ARNr predomină, apoi vin în ordine ARNt şi ARNm care constituie numai 5% din ARN total. Celulele eucariote conţin în plus ARN cu moleculă mică (ARNs) (*small*). De exemplu ARN nuclear cu moleculă mică (ARNsn) (*small nuclear*) participă la îmbinarea exonilor din ARN. Un ARN cu moleculă mică din citozol joacă un rol în declanşarea unei noi sinteze de proteine.

Conceptul de ARN mesager (ARNm) a fost formulat de François Jacob şi Jacques Monod, în 1961. Deoarece proteinele sunt sintetizate în celulele eucariote, în citoplasmă, era evident faptul că trebuia să fie un intermediar chimic specificat de gene, pe care l-au numit mesager. Jacob şi Monod au presupus că acest mesager trebuie să aibă o viaţă intermediară foarte scurtă şi au propus următoarele proprietăţi: mesagerul trebuie să fie un polinucleotid; compoziţia de bază să reflecte compoziţia ADN; trebuie să aibă dimensiuni variate, deoarece genele sau grupele de gene sunt heterogene ca mărime. Ei au presupus corect că 3 nucleotide codează pentru un aminoacid şi au calculat că mesagerul trebuie să aibă greutatea moleculară de cel puţin 1/2 milion. Mesagerul trebuie să fie asociat tranzitoriu cu ribozomii care sunt sediul de sinteză proteică şi de asemenea, mesagerul trebuie să fie sintetizat şi degradat foarte rapid. Nici una dintre clasele de ARN cunoscute (ARNr şi ARNt) nu corespundeau acestor criterii.

Evidenţa a fost făcută, în anul 1961, de Sol Spiegelman prin tehnica hibridizării. Prin această tehnică el a arătat că secvenţa de baze din ARNm este complementară cu cea a matriţei de ADN. Mai mult, a fost trasat fluxul informaţiei genetice în celulă. Prin aceeaşi tehnică de hibridizare şi prin tehnica de marcare cu izotopi radioactivi s-a dovedit că ARNr şi ARNt sunt sintetizaţi de asemenea pe matriţa de ADN, de aceeaşi ARN polimerază. În celulele mamiferelor este o divizare a acţiunii diferitelor feluri de ARN polimerază. Este de remarcat faptul că unele virusuri codează pentru enzimele ce sintetizează ARN foarte diferit de cel al celulei gazdă. De ex: ARN replicaza, codată de Q beta (un fag ARN) este o ARN polimerază ARN dependentă, deoarece primeşte instrucţiuni de la o matriţă ARN, mai degrabă decât de la o matriţă ADN. În contrast cu aceasta, enzimele celulare care sintetizează ARN sunt ARN polimeraze ADN dependente.

ARN polimeraza, ca şi ADN polimeraza, primeşte instrucţiuni de la matriţa ADN. Cea mai timpurie evidenţă a fost aceea că bazele conţinute în ARN nou sintetizat sunt complementare cu cele ale lanţului matriţei de ADN.

De asemenea, experienţe de hibridizare au relevat faptul că ARN sintetizat de ARN polimeraza este complementar cu matriţa de ADN. Matriţele ADN conţin regiuni numite centre sau *situs*-uri de iniţiere, care leagă specific ARN polimeraza şi determină începerea transcrierii. La bacterii sunt două secvenţe la capătul 5' importante pentru primul nucleotid ce va fi transcris. Una dintre ele are drept consens secvenţa TATAAT şi se află la -10 nucleotide la capătul 5' al primului nucleotid transcris, notat cu +1. Alt centru, denumit regiunea -35 are drept consens secvenţa TTGACA.

Primul nucleotid transcris conţine de obicei o purină (figura 33).

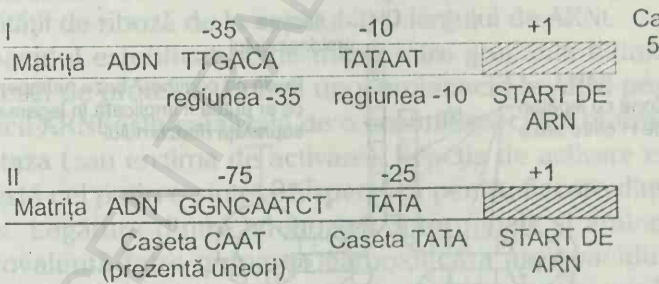


Fig. 33. Centrul de iniţiere a biosintezei de proteine la procariote (I) şi eucariote (II).

Genele eucariote care codează proteinele au ca centru de iniţiere o secvenţă consens TATAAA situată la aprox. -25. Această casetă este asemănătoare cu caseta de la procariote, cu excepţia faptului că se găseşte mai departe. Multe eucariote au de asemenea o secvenţă consens CAAT centrată la aprox. -75. Transcripţia genelor eucariote este stimulată mai departe de secvenţe de activare care pot fi la distanţe de mai multe kilobaze de *situs*-ul de start sau de capătul 5' sau 3'.

ARN polimeraza înaintează de-a lungul matriţei ADN şi transcrie unul din lanţuri până ce este întâlnit un terminator. La E. Coli, semnalul de terminare este o pereche de baze în formă de „ac de păr" pe molecula de

ARN nou sintetizată. Această formaţie în formă de „ac", provine din împerecherea bazelor din secvenţele complementare proprii, bogate în G şi C. Molecula de ARN care este sintetizată se disociază spontan de ARN polimeraza când acest „ac" este urmat de un şir de reziduuri U. Alternativ sinteza de ARN poate fi terminată prin acţiunea unei proteine rho. Despre terminarea transcrierii la eucariote se cunoaşte mai puţin. Lucrul cel mai important de subliniat este acela că semnalele de start şi stop pentru transcriere sunt codate în matriţa de ADN. Aminoacizii se ataşează pe matriţele de ARNm prin intermediul unor molecule de racordare (adaptori). Combinarea cu matriţa este realizată de această „piesă" de racordare prin intermediul unei singure legături covalente. Moleculele de racordare (adaptorii), de care se ataşează diferiţi aminoacizi, formează un grup de molecule de ARN relativ mic, denumit ARN de transfer (ARNt). Condiţia pe care trebuie să o îndeplinească un adaptor eficace este aceea de a se putea ataşa în mod specific de grupările cetonice şi amidice libere, de pe moleculele monocatenare ale matriţe de ARNm. Acest lucru îl realizează tot o moleculă monocatenară de ARN, deoarece aceasta dă posibilitatea stabilirii unor legături de hidrogen foarte specifice, care menţin temporar împreună matriţa şi molecula de racordare. Acest lucru a fost stabilit în 1958 de Francis Crick. În sinteza de proteine, adaptorul este ARNt. Adaptorii de ARNt pentru cei 20 de AA diferiţi au structuri diferite, fiecare fiind adaptat pentru a se potrivi cu o secvenţă nucleotidică diferită de pe matriţă, deci sunt multe tipuri diferite de ARNt. Molecula de ARNt constă dintr-un lanţ mic de aprox. 80 de nucleotide legate între ele prin legături covalente (figura 34).

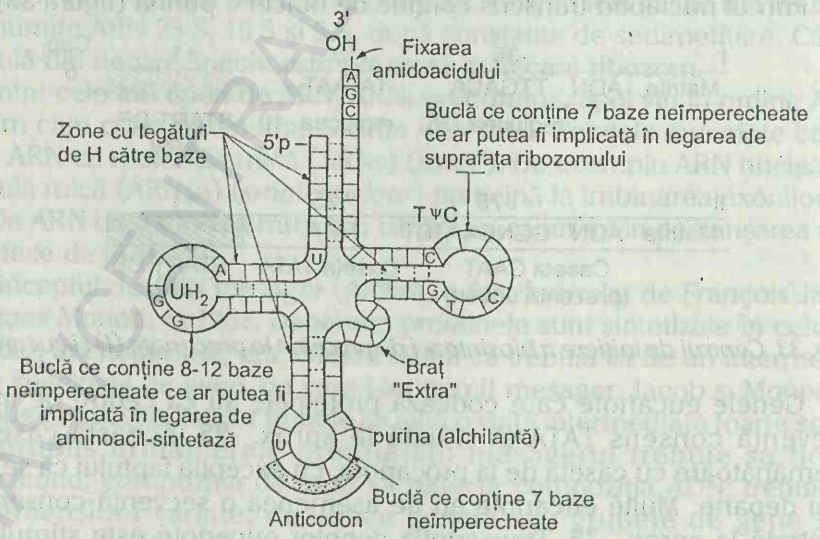


Fig. 34. Structura ARNt.

Capătul 3' al lanţului se termină totdeauna cu o secvenţă CCA. Capătul 5' are de obicei nucleotidul principal G. Deşi este un singur lanţ, majoritatea bazelor sunt legate între ele prin punţi de hidrogen. Bazele în formă de „ac de păr" fac ca cele de pe acelaşi lanţ să se dispună într-un aranjament

dublu helicoidal asemănător cu cel din ADN. Acest fapt favorizează formarea legăturilor de H. Pornind de la structura primară s-a dedus că există un singur mod de pliere a lanţului care să permită un număr maxim de împerecheri de baze şi anume plierea în formă de trifoi. Fiecare „trifoi" cuprinde următoarele segmente de legături de hidrogen:

– Capătul 3' conţine secvenţa ACC şi un al patrulea nucleotid care variază. Locul de legare a aminoacidului este întotdeauna nucleotidul A de la capătul 3'.

– Plecând de la capătul 3' de-a lungul „coloanei vertebrale" a modelului, ajungem la prima buclă a trifoiului. Aceasta este construită din 7 baze neîmperecheate şi ar putea fi implicată în fixarea pe suprafaţa ribozomului.

– Imediat alături, apare o buclă de dimensiuni foarte variate, denumită adesea ciot.

– A treia buclă, care constă din 7 baze neîmperecheate, conţine anticodonul, adică cele trei baze complementare ce se leagă de cele trei baze ce alcătuiesc codonul. Anticodonul este încastrat între o purină, de obicei, alchilată spre capătul 3' şi un uracil în partea 5'.

– Cea de a patra buclă conţine 6-12 baze neîmperecheate şi este relativ bogată în U. Se presupune că intervine în legarea enzimei activatoare specifice (aminoacilsintetaza).

Toate tipurile de ARNt prezintă aceleaşi trăsături generale ce le favorizează adoptarea formei de trifoi. ARNt conţine un centru de ataşare a aminoacidului şi un centru pentru recunoaşterea matriţei. O moleculă de ARNt transportă un aminoacid specific într-o formă activată, la *situs*-ul de sinteză a proteinei. Gruparea carboxil a acestui aminoacid este esterificată la gruparea hidroxil 3' sau 2' a unităţii de riboză de la capătul 3' al lanţului de ARNt.

Aminoacidul esterificat poate migra între grupările hidroxil 2' şi 3' în timpul sintezei de proteină. Unirea unui aminoacid la ARNt pentru a forma un aminoacil-ARNt este catalizată de o enzimă specifică numită aminoacil-ARNt sintetaza (sau enzima de activare). Reacţia de activare este condusă de ATP. Există cel puţin o sintetază specifică pentru fiecare dintre cei 20 de aminoacizi. Legătura dintre adenozina 3' terminală şi aminoacid este o legătură covalentă între gruparea carboxilică a aminoacidului şi riboza terminală a ARN. Faptul că ataşarea adaptorului se realizează prin intermediul grupării carboxilice a aminoacidului are o serie de implicaţii: în primul rând, înainte ca gruparea carboxilică să poată forma o legătură peptidică, molecula de ARNt trebuie să se fi desprins, deci formarea legăturii peptidice şi separarea adaptorului sunt coordonate. În al doilea rând, legătura care uneşte ARNt cu aminoacidul lui specific este o legătură macroergică, deci complexele aminoacid-ARNt sunt precursori „activaţi" şi energia legăturii (legătura aminoacil) poate fi folosită la formarea legăturii peptidice mai săracă în energie. Energia necesară formării legăturii aminoacil provine din legătura macroergică pirofosfat a ATP. Înainte de formarea complexelor AA~ARNt, aminoacizii sunt activaţi de enzima (aminoacilsintetaza) şi formează compuşi de tip aminoacid-adenilat (AA~AMP) în care gruparea

carboxilică a aminoacidului este unită printr-o legătură macroergică cu o grupare de acid adenilic (AMP).

$$AA + ATP \xrightleftharpoons{\text{aminoacilsintetaza}} AA\sim ARNt + AMP$$

Enzimele activatoare recunosc şi leagă atât aminoacidul respectiv, cât şi molecula de racordare corespunzătoare de ARNt. Deci, enzimele trebuie să fie prevăzute cu două sedii de combinare diferite: unul care să recunoască gruparea laterală a unui aminoacid anumit şi al doilea care recunoaşte ARNt specific pentru acel aminoacid.

În mod analog fiecare moleculă de ARNt trebuie să aibă două centre de recunoaştere specifice: unul pentru enzima lui activatoare şi celălalt pentru un grup specific de nucleotide din structura matriţei de ARN. De aici rezultă că gruparea laterală a aminoacidului trebuie să se lege în mod specific de enzima activatoare corectă.

Fiecare celulă trebuie să dispună de cel puţin 20 de tipuri de enzime activatoare diferite şi de tot atâtea tipuri diferite de ARNt.

Formarea legăturilor peptidice are loc pe ribozomi. După cuplarea aminoacizilor cu adaptorii respectivi, ei difuzează pe ribozomii pe suprafaţa cărora are loc sinteza de proteină. Funcţia principală a ribozomilor este aceea de a orienta atât precursorii AA~ARNt care sosesc, cât şi ARNt matriceal în aşa fel încât codul genetic să poată fi citit fără greşeli. Ribozomii dispun de suprafeţe specifice care leagă în poziţii stereochimice adecvate ARNm, precursorii AA~ARNt şi lanţul polipeptidic în curs de creştere. Într-o celulă de E. Coli aflată în faza de creştere rapidă, ribozomii reprezintă cam 1/4 din întreaga masă a celulei. În condiţii optime producerea unui lanţ cu o masă moleculară de 40 000 necesită aprox. 10 sec. Lanţul polipeptidic terminat se desprinde de ribozomii care rămaşi liberi pot fi folosiţi imediat pentru sinteza altor proteine.

Ribozomii sunt construiţi din două subunităţi inegale, subunitatea mai mare fiind aprox. dublă faţă de cea mică. Ambele unităţi conţin atât ARN, cât şi proteine. La ribozomii de E. Coli raportul ARN/proteină este de aprox. 2/1, iar la multe organisme raportul este aprox. 1/1. Cea mai mare parte din proteine îndeplineşte un rol structural. Ambele subunităţi conţin o mare parte de proteine diferite a căror funcţie principală este aceea de a înlesni o poziţie corectă a ARNm şi a precursorilor AA~ARNt. ARN ribozomal nu este purtător de informaţie genetică.

Sinteza de proteine are loc în trei stadii:

Iniţierea constă în legarea unui ARNt iniţiator la semnalul de start al ARNm. Iniţiatorul ARNt ocupă *situs*-ul P (peptidil) de pe ribozom.

Elongarea începe cu legarea unui aminoacil-ARNt la alt *situs* de legare de pe ribozom, care se numeşte *situs*-ul A (aminoacil). Legătura peptidică se formează atunci între gruparea amino a aminoacil – ARNt care intră şi gruparea carboxil a formilmetioninei transportate de iniţiatorul ARNt. Rezultă un dipeptidil-ARNt care se mută apoi de la *situs*-ul A la *situs*-ul P şi molecula

de ARNt iniţiator părăseşte ribozomul. Legarea aminoacil-ARNt, mutarea moleculei de dipeptidil-ARNt de la *situs*-ul A la *situs*-ul P cu asocierea mişcării acidului ARNm la codonul următor sunt posibile prin scindare de GTP. Altă moleculă de aminoacil-ARNt se leagă apoi de *situs*-ul A liber pentru a începe o altă rundă de elongare.

Terminarea se produce atunci când este citit un semnal de stop pe ARNm de către un factor de eliberare a proteinei, fapt ce duce la eliberarea unui lanţ polipeptidic complet de pe ribozomi (figura 35).

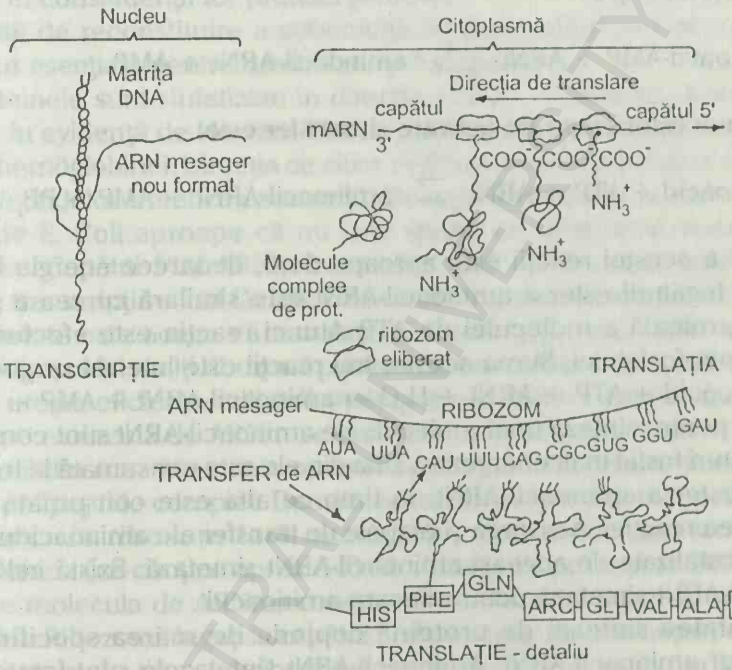


Fig. 35. Reprezentarea schematică a proceselor transcripţiei şi translaţiei. Lanţul ADN este matrice pentru sinteza unui lanţ complementar ARNm. ARNm trece în citoplasmă unde mai mulţi ribozomi se ataşează pe el. Fiecare ribozom sintetizează un polipeptid; fiecare codon din ARN mesager este recunoscut de un anticodon complementar pe ARNt care are un aminoacid special.

Aminoacizii sunt activaţi şi legaţi la un ARN specific de transfer (tARNs) de o sintetază specifică. Intermediarul activat se numeşte aminoacil-ARNt.

Ataşarea unui aminoacid la ARNt este importantă nu numai pentru că activează gruparea carboxil, dar de asemenea, pentru că aminoacizii ei înşuşi nu pot recunoaşte codonii pe ARNm. Aminoacizii trebuie să fie transportaţi la ribozomi de un ARN de transport specific (tARNs) care să recunoască codonii pe ARNm şi deci să acţioneze ca adaptori moleculari. În anul 1957, Paul Zamecnik şi Mahlon Hoagland au descoperit că activarea aminoacizilor şi legarea lor la tARNs sunt catalizate de o sintetază specifică (aminoacil-ARNt sintetaza) denumită de asemenea enzima de activare.

Această primă etapă este formarea unui aminoacil-adenilat de la un aminoacid şi ATP. Forma activată este un amestec anhidru, în care grupul carboxil al aminoacidului este legat de grupul fosforil al AMP, de aceea este cunoscut şi sub denumirea de aminoacil-AMP.

Etapa următoare este transferul grupului aminoacil al aminoacil-AMP la o moleculă de ARNt pentru a forma intermediarul activat aminoacil-ARNt din sinteza de proteină. Unii aminoacizi sunt transferaţi la hidroxilul 2' al ribozei şi alţii la hidroxilul 3'. Aminoacidul activat poate migra foarte rapid între hidroxilul 2' şi 3'.

$$\text{Aminoacil-AMP} + \text{ARNt} \rightleftarrows \text{aminoacil-ARNt} + \text{AMP}$$

Suma acestor etape de activare şi transfer este:

$$\text{Aminoacid} + \text{ATP} + \text{ARNt} \rightleftarrows \text{aminoacil-ARNt} + \text{AMP} + PP_i$$

Δ G° a acestei reacţii este aproape de 0, deoarece energia liberă a hidrolizei legăturii ester a aminoacil-ARNt este similară cu cea a grupării fosforil terminală a moleculei de ATP. Atunci reacţia este efectuată prin hidroliza pirofosfatului. Suma acestor trei reacţii este intens exergonică.

$$\text{Aminoacid} + \text{ATP} + \text{ARNt} + H_2O \rightarrow \text{aminoacil-ARNt} + \text{AMP} + 2P_i$$

Deci: pentru sinteza unei molecule de aminoacil-ARNt sunt consumate două legături fosfat înalt energetice. Una din ele este consumată la formarea legăturii ester a aminoacil-ARNt, în timp ce alta este consumată pentru continuarea reacţiei. Activarea şi etapele de transfer ale aminoacidului special sunt catalizate de aceeaşi aminoacil-ARNt sintetază. Există cel puţin o aminoacil-ARNt sintetază pentru fiecare aminoacid.

Fidelitatea sintezei de proteină depinde de marea specificitate a sintetazelor aminoacil-ARNt. Aminoacil-ARNt sintetazele sunt foarte selective atât în recunoaşterea aminoacizilor care vor fi activaţi, cât şi a viitorului acceptor ARNt. Moleculele de ARNt care acceptă diferiţi aminoacizi au secvenţe de baze diferite şi astfel pot fi cu uşurinţă deosebiţi de către sintetazele lor. O sarcină mult mai importantă pentru aceste enzime este aceea de a face deosebirea dintre aminoacizii similari. De ex: singura deosebire dintre izoleucină şi valină este aceea că izoleucina conţine un grup metil adiţional. Energia de legare adiţională contribuie prin acest grup – CH_2 – să favorizeze activarea izoleucinei peste valină prin izoleucil-ARNt sintetaza. Deşi concentraţia valină în *vivo* este de aprox. 5 ori mai mare decât cea a izoleucinei, valina ar putea fi încorporată din greşeală în proteină în proporţie de numai de 1 la 300. Acest fapt indică existenţa unei etape care măreşte fidelitatea de încorporare a aminoacizilor. De fapt sintetaza îşi corectează propriile erori. Multe aminoacil-ARNt sintetaze conţin *situs*-uri hidrolitice pe lângă *situs*-urile de sinteză. Perechea complementară de *situs*-uri acţionează ca un filtru dublu, *situs*-urile de sinteză îndepărtează aminoacizii care nu sunt corecţi. Deci sintetazele activează aminoacizii şi îi cuplează cu tARNs care

serveşte ca adaptor între două alfabete fundamentale ale sistemelor biologice.

Să ne întoarcem acum la ribozomi, maşinăria moleculară care coordonează interpretarea ARNt, ARNm şi proteinele în procesul complex al sintezei de proteine. Ribozomul de E. Coli este o particulă ribonucleoproteică cu o masă de aprox. 2000 Kd, un diametru de aprox. 200 A şi o constantă de sedimentare de 70 S. Acesta se poate disocia într-o unitate mare (50 S) şi o subunitate mică (30 S). Aceste subunităţi pot fi scindate mai departe în constituenţii lor proteici şi ARNs.

Studii de reconstituire a subunităţii 30 S au arătat că fracţiunea 16 S ARN este esenţială pentru asamblare şi funcţionare.

Proteinele sunt sintetizate în direcţia amino → carboxil. Acest lucru a fost pus în evidenţă de Howard Dintzis prin marcare cu izotopi a leucinei în sinteza hemoglobinei. Direcţia de citire a ARNm a fost determinată cu ajutorul polinucleotidelor sintetice ca matriţă. Direcţia de translatare este 5' → 3'. În celula de E. Coli aproape că nu este spaţiu de timp între transcripţie şi traducere. Capătul 5' al ARNm interacţionează cu ribozomii foarte curând după ce transcripţia a fost făcută. O trăsătură importantă a expresiei genetice la procariote este aceea că translaţia şi transcripţia sunt strâns cuplate în spaţiu şi timp. Mai mulţi ribozomi pot translata simultan o moleculă de ARNm, fapt ce creşte eficienţa utilizării moleculei de ARNm. Grupul de ribozomi legaţi la o moleculă de ARNm se numeşte un poliribozom sau un polizom. Ribozomii din această unitate operează independent, fiecare sintetizând un lanţ de polipeptide complet. Densitatea maximă de ribozomi pe ARNm este de aprox. un ribozom la 8 nucleotide. Polizomii care sintetizează hemoglobina (ce conţine aprox. 145 de aminoacizi pe lanţ sau 500 de nucleotide pe molecula de ARNm) constau din 5 ribozomi legaţi de o moleculă de ARNm. Ribozomii legaţi la capătul 5' al mesagerului are lanţul polipeptidic cel mai scurt, în timp ce ribozomii de la capătul 3' au lanţurile aproape terminate. După ce lanţul polipeptidic a fost eliberat, ribozomii se disociază în subunităţile 30 S şi 50 S (figura 36).

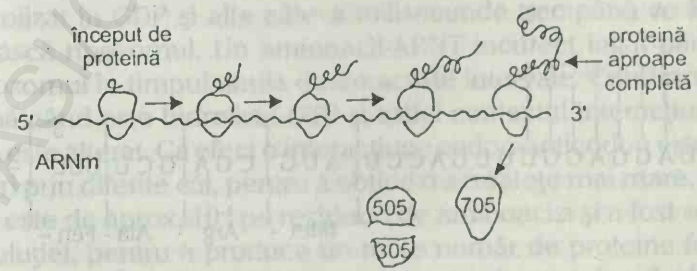
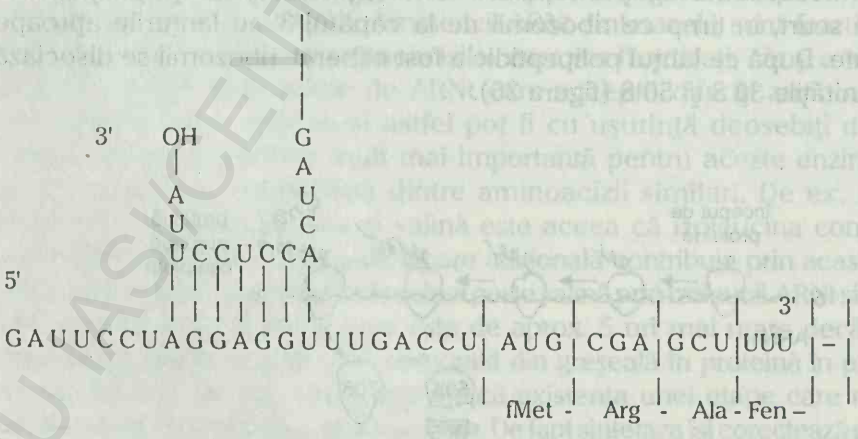


Fig. 36. Schema sintezei hemoglobinei.

Codonul de iniţiere în ARNm este AUG sau mai puţin frecvent GUG. Fiecare regiune de iniţiere conţine o secvenţă bogată în purine, centrată cu aprox. 10 nucleotide la capătul 5' al codonului de iniţiere. Rolul acestei regiuni bogate în purină a devenit evident când s-a găsit că la capătul 3' al componentei ARN 16 S, subunitatea conţine o secvenţă de mai multe baze care este complementară cu regiunea bogată în purine a centrului iniţiator de pe ARNm. Sunt două feluri de interacţiuni care determină unde începe sinteza de proteine: împerecherea bazelor ARNm cu capătul 3' al ARNr 16 S şi împerecherea codonului iniţiator de pe ARNm cu anticodonul iniţiator ARNt f.Met. Pentru aducerea ARNm şi a formilmetionil-ARNt.f la ribozom ca să iniţieze sinteza de proteine sunt esenţiali trei factori proteici de iniţiere (IF_1, IF_2 şi IF_3).

Subunitatea ribozomală 30 S formează întâi un complex cu aceşti trei factori. Hidroliza legăturii GTP legat de IF_2 la intrarea subunităţii 50 S duce la eliberarea IF_1 şi IF_2. Rezultatul este un complex de iniţiere de 70 S. Proteinele L_7 şi L_{12} din subunitatea 50 S participă la hidroliza GTP, care este esenţială pentru formarea unui complex de iniţiere productiv. Proteina L_7 este identică cu L_{12} cu excepţia faptului că terminaţia sa amino este acetilată. În acest stadiu, complexul de iniţiere 70 S este gata pentru faza de elongare a sintezei de proteine. Molecula f.Met-tARNf ocupă centrul P (peptidil) de pe ribozom. Alt centru pentru o moleculă de ARNt, centrul A (aminoacil) este gol. Existenţa unor centre distincte P şi A au fost puse în evidenţă prin studii cu un antibiotic, puromicina. Complexul fMet-tARNf este poziţionat în aşa fel încât tripleta anticodon face pereche cu codonul de iniţiere AUG sau GUG de pe ARNm. Cadrul de citire este definit de această interacţiune şi de împerecherea unei secvenţe de unire bogată în purine cu o secvenţă bogată în baze pirimidinice de pe ARN 16 S. Capătul ribozomal ARN 16 S are aspectul următor:



– ARN mesager
– polipeptid

Ciclul de elongare în sinteza de proteine începe cu inserţia unui aminoacil-ARNt în *situs*-ul A gol de pe ribozom. Felurile distincte de aminoacizi inserate, depind de codonul ARNm care este poziţionat în centrul A. Aminoacil-ARNt complementar este furnizat la *situs*-ul A de o proteină, factor de elongare numită EF-Tu, la fel ca IF_2 care conţine o legătură guanilnucleotid şi oscilează între forma GTP şi GDP. După ce Ef-Tu a fost poziţionat de aminoacil-ARNt la *situs*-ul A, GTP este hidrolizat. Forma GDP a EF-Tu se disociază atunci de ribozom. EF-Ts al doilea factor de elongare, se uneşte cu complexul EF-Tu şi induce disocierea de GDP. În final, GTP se leagă la EF-Tu şi EF-Ts este eliberat concomitent. EF-Tu ce conţine legătura cu GTP este acum gata să lege alt aminoacid şi să-l furnizeze centrului A al ribozomului (întâlnim cicluri GTP-GDP şi în acţiunea hormonilor şi în excitaţia vizuală; pe deasupra în contracţia musculară este un ciclu similar care implică ciclul ATP-ADP).

Centrul guanil-nucleotid a fost conservat în milioane de ani de evoluţie. Este remarcabil faptul că EF-Tu nu interacţionează cu fMet-ARNt. Pe de altă parte acest iniţiator ARNt nu este furnizat centrului A. În contrast, Met-ARNm ca şi alţi aminoacili-ARNt se leagă de EF-Tu. Aceste observaţii justifică faptul că acele codoane interne AUG nu sunt citite de ARNt iniţiator. Fidelitatea sintezei de proteine depinde de prezenţa corectă a aminoacil-ARNt, în centrul A când se formează o legătură peptidică. Acesta este ultimul punct în care celula poate îndepărta un aminoacid incorect citit, înainte ca legătura peptidică să fie făcută. Ne putem aştepta ca aminoacil-ARNt care intră, să fie analizat cu grijă pentru a fi sigur că acela este anticodonul complementar codonului ARNm ce ocupă *situs*-ul A. Un aminoacil-ARNt se poate lega tranzitoriu cu două din cele trei baze ale codonului, dar el va părăsi *situs*-ul A înainte ca legătura peptidică să se formeze. Pentru ribozom trebuie timp ca să decidă dacă legătura aminoacil-ARNt este corectă. Dacă legătura peptidică s-ar forma imediat ce un aminoacil-ARNt soseşte în centrul A, ar fi posibile multe erori. „Ceasornicul" care determină perioada de scurtare este centrul GTP-aza de pe EF-Tu. O legătură peptidică nu poate fi formată până ce EF-Tu nu este eliberat de aminoacil-ARNt. Eliberarea solicită ca GTP să fie hidrolizat în GDP. O medie de mai multe milisecunde trec înainte ca GTP să fie hidrolizat în GDP şi alte câteva milisecunde trec până ce EF-Tu-GDP să părăsească ribozomul. Un aminoacil-ARNT incorect legat părăseşte de obicei ribozomul în timpul unuia dintre aceste intervale. Conformaţia EF-Tu se schimbă când este hidrolizat GTP şi astfel contextul interacţiunii codon-anticodon este alterat. Ca efect o interacţiune codon-anticodon este analizată de două ori prin diferite căi, pentru a obţine o acurateţe mai mare. Frecvenţa de eroare este de aprox. 10^{-4} pe reziduuri de aminoacizi şi a fost selectată în cursul evoluţiei, pentru a produce un mare număr de proteine funcţionale într-un timp scurt. În cazul unei erori în sinteza de proteine de 10^{-2}, aceste proteine vor fi inactive.

În acest stadiu al sintezei de proteine avem un complex în care aminoacil-tRNA ocupă *situs*-ul A şi fMet-ARNt ocupă *situs*-ul P. EF-Tu a părăsit ribozomul.

Este timpul să se formeze legătura peptidică. Această reacţie este catalizată de peptidil-transferaza, o activitate enzimatică a subunităţii 50 S. Unitatea formilmetionina activată a fMet-ARNt (în *situs*-ul P) este transferată la un grup amino al aminoacil-ARNt (în centrul A) pentru a forma o legătură dipeptidil-ARNt. Atacul grupării amino asupra legăturii ester pentru a forma o legătură peptidică este o reacţie termodinamică. Costul de energie liberă pentru formarea unei legături peptidice a fost plătit anterior la formarea unui aminoacil-ARNt. Un tARNf neactivat ocupă *situs*-ul P, în timp ce un dipeptid-ARNt ocupă *situs*-ul A, urmat de formarea unei legături peptidice. Faza următoare a ciclului de elongare este translocaţia. Se produc trei mişcări: ARNt neactivat părăseşte *situs*-ul P, peptidil-ARNt se mută din *situs*-ul A în *situs*-ul P şi ARNm se mută la o distanţă de trei nucleotide. Rezultatul: următorul codon este poziţionat pentru citire de un aminoacil-ARNt următor. Translocaţia solicită al treilea factor de elongare EF-G (numit de asemenea translocaza). EF-G ca şi IF2 şi EF-Tu oscilează între o formă GTP şi GDP. Forma GTP a EF-G este cea care duce la stopul de translocaţie. Hidroliza ulterioară a legăturii GTP face posibilă eliberarea EF-G de pe ribozom. După translocaţie *situs*-ul A este liber, gata să lege un aminoacil-ARNt şi să înceapă o nouă elongaţie. Sinteza de proteine este terminată prin eliberarea factorilor care citesc STOP CODON. În mod normal aminoacil-ARNt nu se leagă la *situs*-ul A al ribozomilor dacă codonul este UAA, UGA sau GAG. De obicei, celulele nu conţin tARNs cu anticodoni complementari acestor stop semnale. În schimb, semnalele sunt recunoscute de factorii de eliberare, care sunt proteine. EF_1 recunoaşte codonul UAA sau UAG. Un al doilea factor de eliberare RF_2 recunoaşte codoanele UAA sau UGA. Astfel proteinele pot recunoaşte secvenţele trinucleotide cu specificitate mare. Legarea unui factor de eliberare la un codon de terminare în centrul A activează oarecum peptidil-transferaza, aşa încât aceasta hidrolizează legătura dintre polipeptide şi ARNt în centrul P. Lanţul polipeptid părăseşte ribozomul urmat de ARNt şi ARNm. În final, ribozomul se desface în subunităţile 30 S şi 50 S şi pot începe sinteza altor molecule de proteină.

Pentru determinarea etapelor pe care le presupune procesul de sinteză a proteinelor s-au dovedit deosebit de utile o serie de antibiotice. De exemplu, puromicina care este un inhibitor foarte puternic al creşterii tuturor celulelor, acţionează prin întreruperea alungirii lanţului. Structura ei seamănă cu aceea a capătului 3' al unei molecule activate de ARNt şi anume cu porţiunea aminoacil-adenozina terminală a aminoacil-ARNt, ceea ce îi permite să pătrundă uşor la nivelul locului de legare „A" a ribozomului, unde împiedică prin competiţie accesul normal al precursorilor AA~ARNt. Mai important este faptul că peptidil transferaza va utiliza puromicina ca pe un substituent, transferând lanţurile în curs de formare spre acceptorii de pe molecula acesteia. Întrucât radicalii de puromicină se leagă slab la locul „A", lanţurile născânde terminate prin puromicină se separă de ribozomi şi astfel se produc lanţuri incomplete de lungime variabilă. Alte antibiotice foarte utile în terapie acţionează diferit.

Streptomicina se leagă de subunitatea 30 S şi este un puternic inhibitor al iniţierii lanţului (procariote) şi produce citirea greşită a ARNm.

Tetraciclina se leagă la subunitatea 30 S şi inhibă legarea aminoacil-tARNs (procariote).

Cloramfenicolul inhibă activitatea peptidil transferazei pe subunitatea ribozomală 50 S.

Eritromicina se leagă la subunitatea 50 S şi inhibă translocaţia (procariote).

Sinteza de proteine la eucariote are multe asemănări cu cea de la procariote, dar şi deosebiri. La eucariote ribozomii sunt mai mari. Ei constau dintr-o subunitate mare de 60 S şi o subunitate mică de 40 S care formează împreună o particulă de 80 S, cu o masă de 4200 Kd, în comparaţie cu 2700 Kd a ribozomilor de procariote. Subunitatea 40 S conţine un ARN 18 S care corespunde subunităţii 16 S de la procariote. Subunitatea 60 S conţine trei ARNs: 5 S şi 28 S ARNs sunt corespunzătoare moleculelor 5 S şi 23 S de la procariote, dar ARN 5,8 S este unică la eucariote.

– ARNt iniţiator. La eucariote aminoacidul iniţiator este metionina mai degrabă decât N-formilmetionina. Cu toate acestea la procariote un ARNt special participă la iniţiere. Acest aminoacil-ARNt este numit Met.tARNf sau Met-tARNi (transcrierea f indică faptul că poate fi formilat în *vitro* şi i este pentru iniţiere).

– Semnalul de începere. Codonul de iniţiere la eucariote este întotdeauna AUG. Eucariotele în contrast cu procariotele nu folosesc o secvenţă bogată în purine la capătul 5' pentru a deosebi iniţiatorul AUGs de o tripletă internă. În schimb AUG în apropiere de capătul 5' al ARNm este selectat de obicei ca *situs* de început. Ribozomii 40 S se ataşează la scufiţa de la capătul 5' a ARNms şi caută un codon AUG mişcându-se în direcţia 3'. Acest proces de căutare este însoţit de hidroliza ATP. Anticodonul Met-ARNt se leagă la subunitatea 40 S şi face pereche cu codonul AUG, fapt ce înseamnă că ţinta a fost găsită. Un ARNm eucariot are numai un singur *situs* de start, deci este matriţă pentru o singură proteină. În contrast ARNm procariot are multiple *situs*-uri de start şi este matriţă pentru mai multe proteine.

– Iniţierea complexelor: eucariotele conţin mai mulţi factori de iniţiere decât procariotele şi interpretarea lor este mai complexă. Sunt cunoscuţi nouă factori de iniţiere şi mulţi constau din subunităţi multiple. Prefixul eIF defineşte un factor de iniţiere eucariotic. GTP formează eIF_2 (1000 Kd) care leagă iniţiatorul ARNt la subunitatea 40 S. Proteina CBPs (*cap-binding proteins*) leagă ARNm de scufiţă. Ei sunt uniţi de eIF_3 care găseşte tripleta AUG aproape de capătul 5'. Factorul eIF_4 este ATP, iar eIF_5 este cel ce induce eliberarea factorilor eIF_2 şi eIF_3 urmată de împerecherea Met-tARNi cu iniţiatorul AUG. Factorul eIF_5 îşi exercită acţiunea prin declanşarea hidrolizei legăturii GTP cu eIF_2. În final, subunitatea ribozomală 60 S se uneşte cu complexul ARNt, ARNm şi subunitatea 40 S pentru a forma complexul de iniţiere.

– Factorii de elongare la eucariote $EF_1 \alpha$ şi $EF_1 \beta$, sunt corespunzători factorilor EF-Tu şi EF-Ts de la procariote. Forma GTP a $EF_1 \alpha$ aduce aminoacil-ARNt în centrul A al ribozomului şi $EF_1 \beta$, catalizează schimbarea GTP în GDP. Factorul EF_2 de la eucariote mediază translocarea condusă de GTP într-un mod foarte asemănător cu cel de la procariote. Terminarea sintezei de proteină este îndeplinită de un singur factor de eliberare eRF, o proteină legată de GTP, în comparaţie cu doi factori la procariote. În sfârşit, eIF_3 la fel cu omologul de la procariote, previne reasocierea subunităţilor ribozomale în absenţa complexului de iniţiere.

La eucariote, translaţia este reglată de proteinkinază, care inactivează factorul de iniţiere. Fosforilarea subunităţii α eIF_2 (factorul de iniţiere care aduce Met-ARNt la subunitatea ribozomală 40 S) blochează reciclarea eIF_2 şi astfel îl face incapabil să iniţieze sinteza de proteine. Studii efectuate pe reticulocite au arătat că fosforilarea numai a 30% din eIF_2 duce la încetarea completă a sintezei de proteină. Factorul eIF_2 devine funcţional numai după îndepărtarea grupării fosfat de către o fosfatază specifică. Rolul fiziologic al fosforilării factorului eIF_2 în reticulocite este acela de a coordona sinteza hemului şi globinei. Când nivelul hemului este mic, sinteza de globină încetează pentru a preveni formarea apohemoglobinei care este denaturată cu uşurinţă. Se pare că un sistem asemănător de fosforilare a eIF_2 de către diferite kinaze este folosit şi de alte celule prin controlul translaţiei. Descoperirea unor kinaze care induc interferonul care acţionează similar în celulele infectate cu virus, sugerează că acest mecanism este larg folosit pentru controlul exprimării genei la celulele eucariote.

Toxina diftrică blochează sinteza de proteine la eucariote prin inhibiţia translocaţiei. Difteria a fost o cauză majoră de deces în copilărie înainte de imunizare. Efectul letal al acestei boli se datorează în special unei toxine puternice produsă de *Corynebacterium diphteriae*, o bacterie care se dezvoltă în tractul respirator superior. Gena care codează toxina provine de la un fag adăpostit în unele tulpini de *C. diphteriae*. Câteva micrograme de toxină diftrică sunt de obicei letale la persoanele neimunizate, deoarece aceasta inhibă sinteza proteică. Toxina diftrică constă dintr-un singur lanţ de 61 Kd cu două legături disulfit şi este o proteină bipartită. Domeniul A catalizează modificarea covalentă a unui component cheie în mecanismul de sinteză a proteinei, în timp ce domeniul B face posibilă traversarea domeniului A prin membrana plasmatică şi pătrunderea în citozol. Legarea domeniului B la un receptor specific (neidentificat încă) de pe suprafaţa celulei, declanşează clivarea toxinei într-un fragment A de 21 Kd şi un fragment B de 40 Kd, reducerea legăturii disulfit dintre ele şi transferul fragmentului A în citozol. Un singur fragment A al toxinei în citozol poate omorî o celulă. De ce este atât de nociv? Ţinta activităţii enzimatice a fragmentului A este EF_2, factorul de elongaţie care dirijează translocaţia în sinteza de proteine la eucariote. EF_2 conţine diftamida, un reziduu de aminoacid neobişnuit, a cărui funcţie nu este cunoscută, încă. Acesta este format prin modificarea

posttranslaţională a histidinei. Fragmentul A al toxinei catalizează transferul adenozin difosfat-ribozei al moleculei de NAD^+ la un atom de N al inelului diftamidei. Această ADP ribozilare a unui singur centru al lanţului factorului de elongaţie EF2, blochează capacitatea sa de a îndeplini translocaţia peptidului sintetizat. Sinteza de proteină încetează, justificând toxicitatea mare a toxinei difterice.

Toxina difterică blochează sinteza proteinei prin transferul unei molecule de ADP-riboză de la NAD^+ la diftamină, un reziduu de aminoacid modificat pe factorul 2 de elongaţie (translocaza).

Este interesant de observat că o varietate de alte toxine, ca toxina holerei şi toxina pertussis constau de asemenea dintr-un domeniu care leagă un receptor de pe suprafaţa celulei şi un domeniu catalitic, care modifică ireversibil un constituent celular important.

4.2. Metabolismul normal și patologic al glucidelor

Introducere în metabolismul glucidelor. Generalităţi

Organismele îţi menţin structurile lor complexe în stare dinamică, cu ajutorul energiei pe care o iau din mediul înconjurător, o dată cu alimentele. Ele au posibilitatea să elibereze şi să stocheze energia chimică din alimente şi să creeze molecule complexe din cele simple, pentru a construi structuri noi. Aceste procese colective alcătuiesc metabolismul şi implică transformarea materiei şi energiei prin reacţii catalizate de enzime. În aceste secvenţe produsul unei reacţii enzimatice devine substrat pentru reacţia următoare din secvenţă: produşii succesivi de reacţie sunt metabolizaţi sau devin intermediari metabolici.

Cele două aspecte ale metabolismului

I – Catabolismul – cuprinde procesele prin care moleculele complexe sunt scindate în molecule simple. În primul stadiu, substanţe complexe ca amidon, proteine sau trigliceride sunt scindate în fragmente mici: monozaharide, aminoacizi, glicerol şi acizi graşi. În timpul acestui stadiu nu se acumulează energie sau aceasta se face în cantitate foarte mică. În stadiul următor, moleculele simple de diferite feluri sunt catabolizate la molecule ce pot fi oxidate la dioxid de carbon şi apă. În acest stadiu este captată energia liberă sub formă de ATP (adenozin trifosfat). Stadiul final al căii metabolice constă din: a) ciclul acidului citric; b) sistemul de transport de electroni; c) fosforilarea oxidativă. În procesul de cataliză, în ultimă instanţă, se oxidează acetil coenzima A (acetil CoA) la CO_2 şi apă şi se stochează energia sub formă de ATP (figura 37).

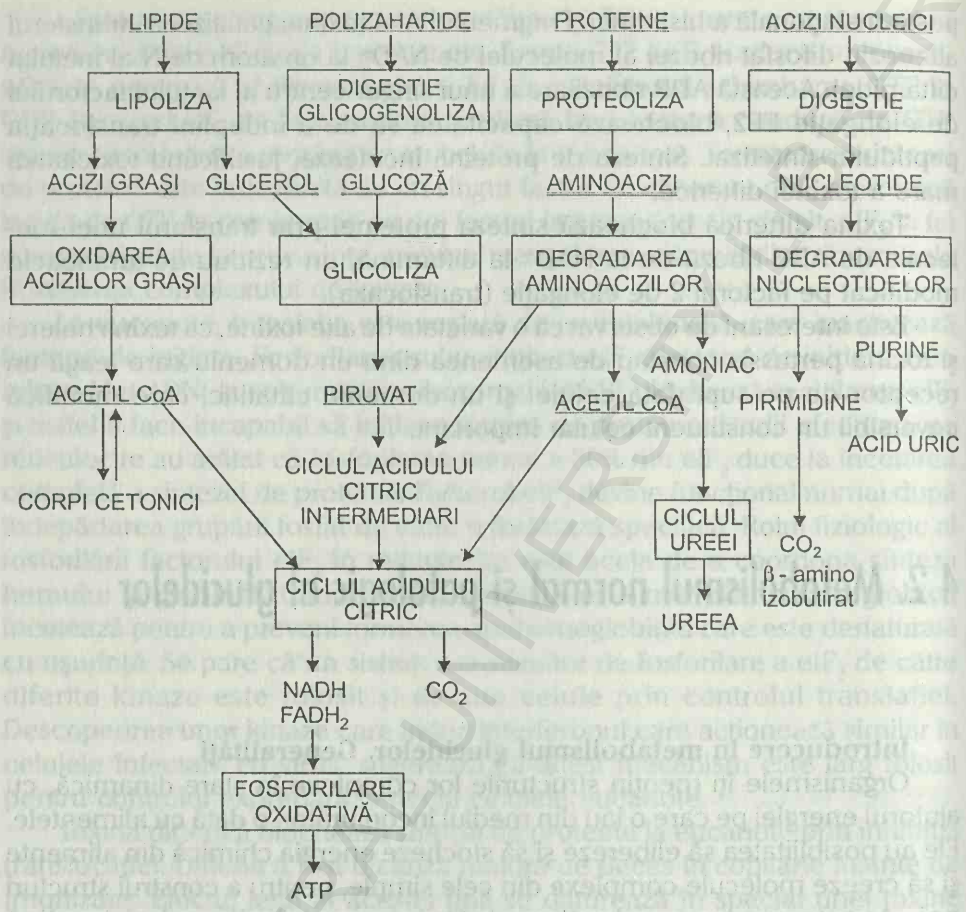


Fig. 37. Căile catabolice importante ale glucidelor.

II – Anabolismul – cuprinde procesele de biosinteză ale metabolismului implicate în combinarea componenţilor în complexele macromoleculare solicitate de organism. Procesele anabolice solicită energia care poate fi furnizată prin două căi: a) prin ATP furnizat de căile metabolice; b) în unele cazuri prin hidrogenul înalt energetic furnizat de nicotinamid-adenindinucleotid fosfat(NADH) (figura 38).

Compartimentarea căilor metabolice în celulă

Setul de enzime care catalizează o cale metabolică particulară este localizat în compartimente intracelulare specifice.

1. Citozolul conţine enzime care catalizează următorul set de reacţii: glicoliza; metabolismul pentozelor; sinteza acizilor graşi.

2. Matricea mitocondrială conţine enzime care catalizează următorul set de reacţii: ciclul acidului citric; fosforilarea oxidativă; ß oxidarea acizilor graşi; formarea corpilor cetonici.

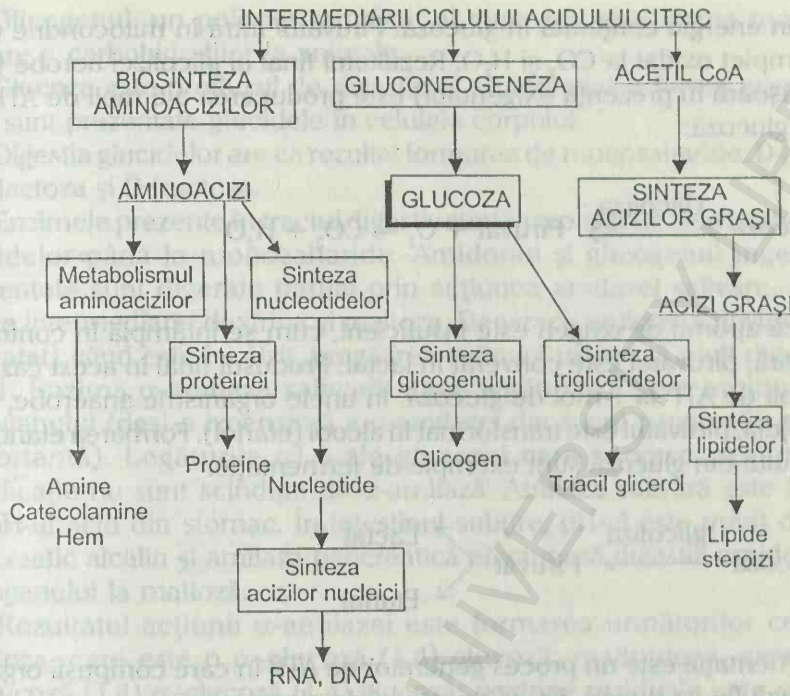


Fig. 38. Căile anabolice importante ale glucidelor.

Compartimentarea căilor metabolice permite separarea proceselor ce se produc în direcţii opuse, care ar putea interfera altfel cu alte procese. Ex: procesele anabolice implicate în biosinteza acizilor graşi pornind de la acetil CoA se petrec în citozol; procesele catabolice implicate în oxidarea acizilor graşi la acetil CoA au loc în matricea mitocondrială.

4.2.1. Metabolismul glucidelor. Glicoliza

Glicoliza este o cale aproape universală de generare a energiei în sistemele biologice. Denumirea (glicoliză) provine de la cuvintele greceşti *glycos* – zahăr şi *lysis* – desfacere, dizolvare.

În esenţă glicoliza este o suită de reacţii enzimatice prin care glucoza provenită din metabolizarea glucidelor este convertită în piruvat, cu producere de ATP. Fie că glicoliza este aerobă, fie că este anaerobă, rezultatul final este producerea de ATP (adenozin-trifosfat) care alimentează cu energie celulele organismului. ATP este produs în stadii diferite ale glicolizei, dar este de asemenea consumat în alte stadii. În timpul ultimei etape a glicolizei (producere de piruvat) are loc o reacţie enzimatică ce produce ATP.

În condiţii aerobe, glicoliza este preludiul ciclului acidului citric şi al lanţului de transport de electroni, care împreună captează cea mai mare

parte din energia conţinută în glucoză. Piruvatul intră în mitocondrie unde este complet oxidat la CO_2 şi H_2O. Rezultatul final al glicolizei aerobe (care se desfăşoară în prezenţa oxigenului) este producerea a 6 moli de ATP per mol de glucoză:

$$\text{Glucoza} \xrightarrow{\text{Glicoliza}} \text{Piruvat} + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$$

Dacă aportul de oxigen este insuficient, cum se întâmplă în contracţia musculară, piruvatul este convertit în lactat. Produsul final în acest caz este de 2 moli de ATP la 1 mol de glucoză. În unele organisme anaerobe, cum este drojdia, piruvatul este transformat în alcool (etanol). Formarea etanolului şi lactatului din glucoză sunt exemple de fermentaţie.

$$\text{Glucoza} \xrightarrow{\text{glicoliza}} \text{Piruvat} \begin{cases} \nearrow \text{Lactat} \\ \searrow \text{Etanol} \end{cases}$$

Fermentaţia este un proces generator de ATP în care compuşii organici acţionează fie ca donori, fie ca acceptori de electroni.

Fermentaţia a fost descoperită de Pasteur în 1860. El afirmă că acest proces este legat de celula vie „viaţă fără aer". Elucidarea completă a căii glicolizei a fost posibilă în anul 1940, datorită contribuţiilor remarcabile ale lui Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Takob Parnas, Otto Warburg, Gerti Cori şi Carl Cori. Glicoliza este uneori numită: Calea Embden-Meyerhof.

Prin definiţie: Glicoliza este un proces în care glucidele sunt descompuse în molecule de glucoză, care apoi sunt lizate printr-o serie de 9 reacţii enzimatice în 2 molecule de piruvat. Scopul final al glicolizei, fie că este aerobă, fie că este anaerobă, este producerea de adenozintrifosfat (ATP) care alimentează cu energie celulele corpului. ATP este produs în stadii diferite ale glicolizei, dar este deasemenea consumat în multe stadii. În timpul etapei finale a glicolizei (cea a producerii de piruvat) are loc o reacţie enzimatică prin care este generat ATP.

I. În glicoliza anaerobă, care funcţionează în absenţa oxigenului, se produc în final 2 moli de ATP pe 1 mol de glucoză.

II. Glicoliza aerobă ce funcţionează în prezenţa oxigenului produce în final 6 moli ATP pe 1 mol de glucoză.

Sursele de carbon şi energie pentru glicoliză

Amidonul provenit din ingerarea plantelor, este sursa majoră.

Lactoza, un dizaharid format din glucoză şi galactoză, este componentul glucidic principal din lapte.

Fructoza, un izomer cetoză al glucozei, este ingerată fie cu fructele, fie atunci când ingerarea de sucroză (un dizaharid glucoză-fructoză) este mare.

Glicogenul, un polimer ramificat al glucozei, este forma majoră de stocare a carbohidraţilor la animale.

Glucoza este produsul de digestie al amidonului şi forma esenţială în care sunt prezentate glucidele în celulele corpului.

Digestia glucidelor are ca rezultat formarea de monozaharide: D-glucoza, D-galactoza şi D-fructoza.

Enzimele prezente în tractul digestiv sunt responsabile de metabolizarea glucidelor până la monozaharide. Amidonul şi glicogenul ingerate cu alimentele sunt digerate parţial prin acţiunea amilazei salivare, până la forme intermediare: dextrina şi maltoza. Deoarece amidonul devine solubil (hidratat) când este încălzit, pregătirea culinară uşurează mult digestia.

1. Enzima α-amilaza salivară atacă legăturile1,4 ale amidonului şi glicogenului (deşi o izoenzimă a α-amilazei din sucul pancreatic este mai importantă). Legăturile α1,6 ale glucozei care servesc ca puncte de ramificaţie nu sunt scindate de α-amilază. Amilaza salivară este inhibată de pH-ul acid din stomac. În intestinul subţire, pH-ul este mărit de sucul pancreatic alcalin şi amilaza pancreatică efectuează digestia amidonului şi glicogenului la maltoză.

Rezultatul acţiunii α-amilazei este formarea următorilor compuşi: maltoza, care este o α–glucoză (1,4) glucoză; maltotrioza, care este o α–glucoză (1,4) α–glucoză (1,4) glucoză; dextrine reziduale care sunt molecule înalt ramificate, compuse din aprox. 8 unităţi de glucoză, unite prin una sau mai multe legături α 1,6, care nu pot fi degradate mai departe.

2. Oligozaharidazele completează hidroliza dizaharidelor şi oligozaharidelor pe suprafaţa celulelor epiteliale din intestinul subţire. Aceste enzime îndepărtează succesiv unităţile de la capătul opus grupelor aldehidă sau cetonă.

3. α- glucozidazele din intestinul subţire la om se produc în exces, ca toate enzimele ce hidrolizează sucroza. Spre deosebire de aceasta, ß - galactozidaza, enzima solicitată pentru hidroliza lactozei poate avea o producţie limitată (figura 39).

Monozaharidele rezultate din digestia glucidelor (D-glucoză, D-galactoză şi D-lactoză) sunt transportate prin celulele epiteliale ale intestinului printr-un proces enzimatic de transfer activ. Acest fapt se deduce după viteza de absorbţie, care este de câteva ori mai mare pentru glucoză şi galactoză decât pentru xyloză, care este absorbită printr-un proces de difuzie pasivă. În timpul procesului de absorbţie se poate produce conversia fructozei la glucoză, fapt pus în evidenţă prin prezenţa compusului enediol, care reprezintă forma comună a celor două monozaharide.

În transportul activ al monozaharidelor prin celulele epiteliale ale intestinului în interiorul lumenului sunt implicate 2 sisteme:

a) Sistemul de transport al monozaharidelor dependent de Na^+. Acest sistem de transport activ este specific pentru D-glucoză şi D-galactoză şi poate fi inhibat de Florizin, un glicozid extras din plante, care inhibă de asemenea

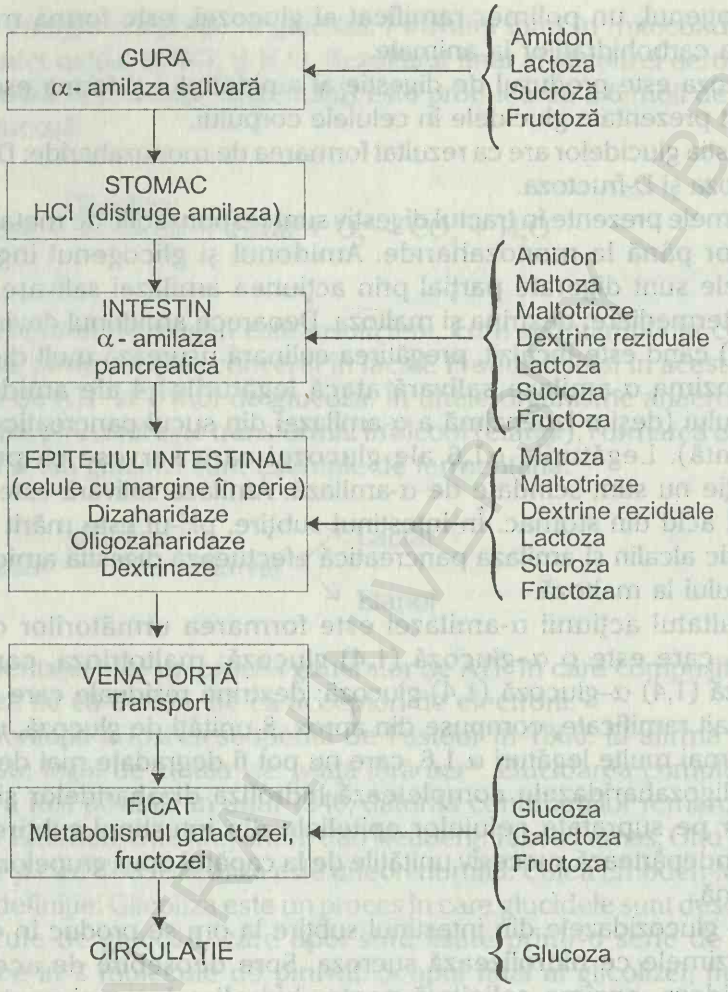


Fig. 39. Calea digestiei glucidelor din alimente.

şi sistemul de transport al monozaharidelor Na^+ dependent din tubulii renali şi ale celule şi ţesuturi.

b) Sistemul de transport al monozaharidelor independent de Na^+. Acest sistem de transport activ este specific pentru transportul D-fructozei prin facilitarea difuziei. Cytochalazina B, un produs extras din mucegai, inhibă acest sistem. De asemenea acest produs inhibă şi sistemul de transport al monozaharidelor independent de Na^+ în alte celule şi ţesuturi. Transportul monozaharidelor în afara celulelor epiteliale este catalizat de un alt sistem de transport independent de Na^+, distinct, care este specific pentru D-glucoza şi D-galactoza.

Pentru a descrie procesul general de metabolizare a glucidelor au fost folosiţi diferiţi termeni:

– Glicogeneza se referă la conversia glucidelor în glicogen.

– Glicogenoliza se referă la scindarea glicogenului pentru a forma glucoza şi alţi produşi intermediari.

– Gluconeogeneza cuprinde procesul de formare a glucozei din alţi produşi decât glucidele, cum sunt: aminoacizi, glicerol şi acizi graşi.

Conversia glucozei sau altor hexoze în lactat sau piruvat se numeşte glicoliză. Rezultatul tuturor factorilor implicaţi în aceste procese diferite determină nivelul glucozei în sânge.

Glicoliza / Calea Embden-Meyerhof. Pentru a înţelege mai bine evenimentele ce au loc în timpul glicolizei, trebuie să subliniem câteva caracteristici ale tipurilor de reacţie şi ale reactanţilor care participă la ele.

– În glicoliză intermediarii au sau 6 atomi de C sau 3 atomi de C. Produşii cu 6 atomi sunt derivaţi ai glucozei sau fructozei; cei cu 3 atomi de C sunt derivaţi din dihidroxi-acetonă, gliceraldehidă, glicerol şi piruvat.

– Toţi intermediarii dintre glucoză şi piruvat sunt fosforilaţi, grupul fosforil fiind legat ca ester sau anhidridă.

În glicoliză se produc următoarele tipuri de reacţie: transfer de grup fosforil de la ATP la un intermediar din glicoliză sau invers; schimbare de grup fosforil într-o moleculă de la un atom de oxigen la altul; izomerizare (o cetoză este convertită în aldoză sau invers); deshidratare (se elimină o moleculă de apă); clivaj aldol (o legătură carbon-carbon este scindată printr-o condensare aldolică).

Reacţiile din calea glicolitică au loc în citozol.

Primul stadiu este conversia glucozei în fructoza 1,6 bifosfat ($F_{1,6}BP$). Acest stadiu solicită energie şi constă în trei etape: o fosforilare, o izomerizare şi o a doua etapă de fosforilare. Strategia acestor etape iniţiale este captarea substratului în celule şi formarea de compuşi care pot fi clivaţi cu uşurinţă în unităţi fosforilate de câte 3 atomi de C, care vor furniza ulterior energia.

Etapa 1: Glucoza → Glucoza - 6 - Fosfat (G_6P).

Glucoza pătrunde în celulă printr-un proces de transport specific şi este fosforilată de ATP, pentru a forma glucoza-6-fosfat. Transferul grupei fosforil de la ATP la grupul hidroxil al C_6 al glucozei este catalizat de o kinază. Pentru că transferul se face la un glucid cu 6 atomi de C (hexoza) enzima se numeşte hexokinaza.

Ca toate celelalte kinaze, hexokinaza necesită pentru activitatea sa ioni de Mg^{2+} sau alţi ioni metalici divalenţi (Mn^{2+}). În această etapă este consumată o moleculă de ATP. Reacţia este ireversibilă.

a) Hexokinaza este o enzimă alosterică, puternic inhibată de produsul său (G_6P).

b) Multe izoenzime ale hexokinazei au constanta Michaelis (K_M) scăzută pentru glucoză şi pentru alte substrate hexoze şi iau cu uşurinţă glucoza şi alte hexoze din sânge. Izoenzima hexokinazei din creier are în special un K_M pentru glucoză foarte scăzut.

c) În contrast, ficatul este unic prin aceea că enzima majoră pentru fosforilarea glucozei este glucokinaza. Această enzimă specifică pentru glucoză are un KM mare, fapt care îi permite să manevreze marea concentraţie de glucoză care este prezentă după masă în sângele din vena portă. Glucokinaza este o enzimă determinantă a cărei sinteză creşte ca răspuns la ingerarea de glucide sau la secreţia de insulină.

Producerea de G_6P este de importanţă capitală. El nu este numai un intermediar al căii glicolitice, dar de asemenea serveşte ca precursor pentru multe alte căi metabolice fie anabolice, fie catabolice.

Etapa a 2-a în glicoliză este izomerizarea glucozo-6-fosfatului la fructozo-6-fosfat (F_6P) ceea ce înseamnă conversia unei aldoze într-o cetoză. Reacţia este catalizată de enzima fosfoglucozo-izomeraza (PGI). Este o reacţie reversibilă, controlată prin nivelul substratului (control stoichiometric).

Etapa a 3-a constă dintr-o nouă fosforilare. Reacţia este catalizată de enzima fosfofructokinaza (PFK) şi este ireversibilă. Fructoza-6-fosfat este fosforilată de ATP şi produsul este fructoza 1,6 – bifosfatul. Compusul a fost cunoscut anterior ca fructoza 1,6 – difosfat (bifosfatul înseamnă 2 grupe fosfat separate, în timp ce difosfat (ca în adenozin difosfat, înseamnă 2 grupe fosfat legate între ele; de aceea se preferă denumirea fructoza 1,6 bifosfat).

PFK – este o enzimă limitatoare a glicolizei în multe ţesuturi şi este enzima reglatoare majoră a glicolizei. Este o enzimă alosterică controlată de ATP şi de mulţi alţi metaboliţi.

a) Activatorii PFK:

– F_6P este substratul şi activatorul fosfofructokinazei.

– Adenozinmonofosfatul (AMP) care semnalează o scădere energetică, activează PFK şi creşte fluxul metabolic prin glicoliză, furnizând mai mult piruvat pentru generarea de ATP în mitocondrie.

– Fructoza 2,6 – bifosfat care se formează din F_6P, când aceasta este în cantitate mare, activează PFK numai în celulele hepatice. Aceasta creşte afinitatea PFK pentru F6P şi diminuează efectul inhibitor al ATP.

– Fosfofructokinaza-2, enzima care sintetizează $F_{2,6}BP$, este de asemenea reglatoare fiind inhibată de citrat şi ATP şi semnalizând o reducere a glicolizei.

b) Inhibitorii PFK: ATP descreşte afinitatea PKF pentru F_6P şi interferă cu activarea PFK de AMP. O concentraţie mare de ATP celular indică saturarea rezervelor de energie şi dă semnalul pentru încetinirea glicolizei.

– Citratul inhibă PFK, ca şi sinteza de $F_{2,6}BP$, împiedicând activarea PFK în ficat. Citratul este format în mitocondrie în timpul oxidării fragmentelor de 2 carboni de la piruvat. Când concentraţia de ATP este mare, citratul nu este metabolizat mai departe, dar acesta intră în citoplasmă. Semnalul unei stări energetice mari, duce la încetinirea glicolizei.

Formare de gliceraldehida-3 fosfat prin reacţii de clivare şi izomerizare reprezintă stadiul al doilea.

Fructoza 1,6 bifosfatul ($F_{1,6}BP$) este scindat în 2 trioze: gliceraldehida-3-fosfat şi dihidroxiaceton-fosfat. Etapele următoare ale glicolizei se referă la unităţi de 3 atomi de C. Reacţia este catalizată de aldolază.

Dihidroxiacetonfosfatul poate fi convertit cu uşurinţă în gliceraldehid-3-fosfat, care este substratul pentru reacţia următoare. Reacţia este catalizată de o izomerază: triozo-fosfatizomeraza.

Astfel, dintr-o moleculă de fructoză 1,6 bifosfat sunt formate 2 molecule de gliceraldehidă-3-fosfat prin activitatea aldolazei şi triozo-fosfatizomerazei. Reacţia de izomerizare este complet reversibilă, dar pentru că G_3P este folosit în reacţiile următoare, aceasta schimbă echilibrul în direcţia conversiei compuşilor esenţiali: DHAP în G_3P.

În etapa anterioară a glicolizei, o moleculă de glucoză a fost transformată în 2 molecule de gliceraldehidă-3-fosfat. În timpul acestor reacţii nu s-a acumulat energie, ci din contra au fost consumate 2 molecule de ATP.

Stadiul al treilea de producere a energiei (transformarea triozofosfatului în piruvat). În secvenţele următoare, o parte din energia acumulată în gliceraldehid-3-fosfat este eliberată. Reacţia iniţială a secvenţei este conversia gliceraldehid-3-fosfatului în 1,3 bifosfoglicerat (1,3 BPG). Această reacţie reversibilă solicită nicotin-amidadenin-dinucleotidul (NAD), ca acceptor de electroni. Enzima ce catalizează reacţia este (G_3PD) gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza. Rezultatul reacţiei este un compus fosfat înalt energetic. În forma sa oxidată NAD^+ se leagă strâns de enzimă. Fosforilarea duce la exprimarea fosforului anorganic şi este un exemplu de fosforilare oxidativă a substratului.

– La acest nivel arsenatul (AsO_4^{3-}) poate decupla oxidarea şi fosforilarea. AsO_4^{3-} poate substitui P_i în reacţia de fosforilare prin combinare cu intermediari tioesteri pentru a forma un compus instabil (1 arseno-3-fosfoglicerat).

– 1 arseno-3-fosfogliceratul este scindat pentru a da 3-fosfoglicerat (3 PG), un produs intermediar al căii glicolitice nefosforilat.

Produsul reacţiei 1,3 bifosfatul este un compus fosfat înalt energetic, un acil-fosfat (un amestec de acid fosforic anhidru şi acid carboxilic), de aceea 1,3 BPG are un potenţial de transfer de grup mare. În prima etapă 2 moli de 1,3 BPG au fost formaţi din fiecare mol de glucoză, deci rezultă 2 moli de ATP din fiecare mol de glucoză consumată.

În etapa următoare a glicolizei, potenţialul mare de transfer al 1,3 BPG este folosit pentru generarea de ATP. Aceasta este prima reacţie generatoare de ATP în glicoliză şi un alt exemplu de fosforilare oxidativă a substratului.

Enzima fosfoglicerat kinaza catalizează transferul grupării fosforil de la fosfatul acil al 1,3 BPG, la ADP. Produsul reacţiei este ATP şi 3-fosfogliceratul.

Bilanţul reacţiei este următorul: gliceraldehida 1,3 bifosfat a fost oxidată la 3-fosfoglicerat, un acid carboxilic; NAD^+ a fost redus la NADH; ATP a fost format din ADP şi P_i.

Formarea piruvatului şi generarea celei de a doua molecule de ATP. În ultima etapă a glicolizei, 3-fosfogliceratul este convertit în piruvat şi se formează a doua moleculă de ATP. Prima reacţie este o rearanjare. Poziţia grupării fosforil se schimbă de la 3-fosfoglicerat la 2-fosfoglicerat (2 - PG). Reacţia este catalizată de fosfogliceromutaza. Reacţia este reversibilă şi

solicită un cofactor: urme de 2,3 - bifosfoglicerat (2,3 BPG) care este prezent în cantitate mică în multe celule. Mutaza este o enzimă ce catalizează mutările intracelulare ale unei grupări chimice, cum este grupul fosforil.

În a 2-a reacţie se formează un enol prin deshidratarea 2-fosfogliceratului. Enolaza catalizează formarea fosfoenolpiruvatului (PEP). Această reacţie de deshidratare creşte potenţialul grupului fosforil. Reacţia catalizată de o enolază este reversibilă.

În ultima reacţie a glicolizei, fosfoenolpiruvatul (PEP) este transformat în piruvat. Reacţia este ireversibilă în condiţiile celulare şi este catalizată de o piruvatkinază, care se găseşte în ficat şi este puternic activată de $F_{1,6}BP$. Piruvatkinaza este o enzimă alosterică. Activitatea ei este inhibată de ATP, alanină, acizi graşi şi Acetil-CoA (figura 40).

Produsul reacţiei este exprimat astfel: din molecula iniţială de glucoză se formează 2 moli de piruvat. Deci producţia netă de ATP per molecula de glucoză folosită pentru producerea piruvatului este de + 2 moli (-2+2+2); formarea ATP din ADP ca expresie a legăturii fosfoenol înalt energetic a PEP este alt exemplu de fosforilare oxidativă a substratului.

Tabelul 10

Sinteza reacţiilor din glicoliză

Etapa	Reacţia	Enzima	Tipul reacţiei*
1	Glucoza + ATP → glucoza-6-fosfat + + ADP + H^+	hexokinaza	a
2	Glucoza 6-fosfat ⇄ fructoza-6-fosfat	fosfoglucozoizomeraza	c
3	Fructoza-6-fosfat + ATP → fructoza 1,6 bifosfat + ADP + H^+	fosfofructokinaza	a
4	Fructoza 1,6 bifosfat ⇄ dihidroxiacetone fosfat + gliceraldehida	aldolaza	a
5	Dihidroxiacetonefosfat ⇄ gliceraldehida 3-fosfat	trioze fosfat izomeraza	c
6	Gliceraldehide 3-fosfat + P_i + NAD^+ ⇄ 1,3 bifosfoglicerat + NADH + H^+	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenază	f
7	1,3 bifosfoglicerat + ADP ⇄ 3 fosfoglicerat + ATP	fosfoglicerat kinaza	a
8	3-fosfoglicerat ⇄ 2 fosfoglicerat	fosfogliceromutaza	b
9	2-fosfoglicerat ⇄ fosfoenolpiruvat + + H_2O	enolaza	d
10	Fosfoenolpiruvat + ADP + H^+ → piruvat + ATP	piruvat kinaza	a

* Tipurile de reacţie: a – transfer de grup fosforil; b – mutare de grup fosforil; c – izomerizare; d – deshidratare; e – clivare aldol; f – fosforilare cuplată cu oxidare.

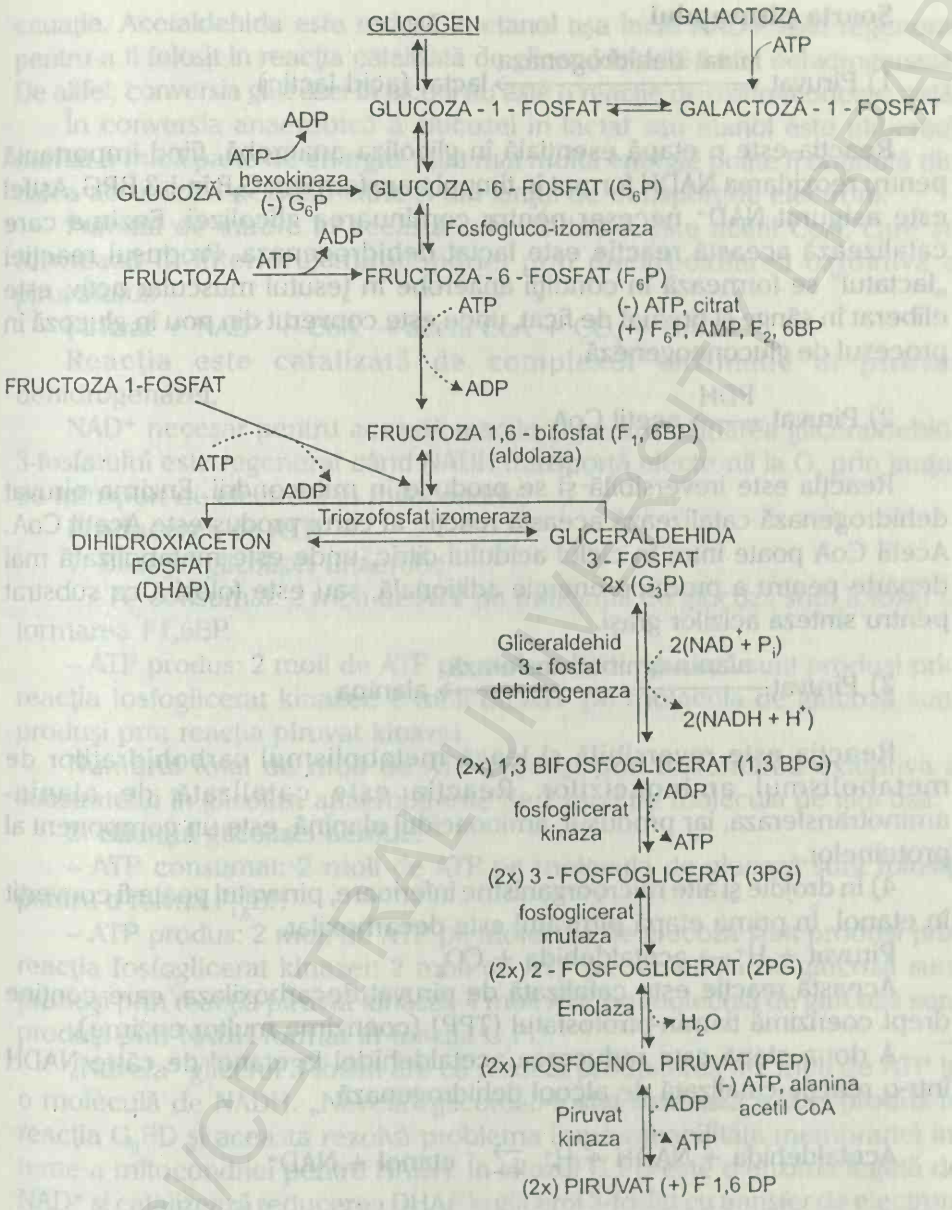


Fig. 40. Calea glicolizei. Reacţia netă a transformării unei molecule de glucoză în piruvat are ca rezultat obţinerea a două molecule de ATP. Semnele (+) şi (-) indică locul de acţiune a modulatorilor alosterici pozitivi şi negativi ai activităţii enzimelor reglatoare cheie, (+) activatori, (-) inhibitori. AMP = adenozin monofosfat; ADP = adenozin difosfat; ATP = adenozin trifosfat; $F_{2,6}BP$ = fructoză 2,6 bifosfat; NAD^+ = nicotin amid dinucleotid oxidat NADH = NAD redus; Pi = fosfor anorganic.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Soarta piruvatului

1) Piruvat $\xrightarrow{\text{lactat dehidrogenaza}}$ lactat (acid lactic)

Reacţia este o etapă esenţială în glicoliza anaerobă, fiind importantă pentru reoxidarea NADH format în timpul transformării G_3P în 1,3 BPG. Astfel este asigurat NAD^+ necesar pentru continuarea glicolizei. Enzima care catalizează această reacţie este lactat dehidrogenaza. Produsul reacţiei „lactatul" se formează în condiţii anaerobe în ţesutul muscular activ, este eliberat în sânge şi preluat de ficat, unde este convertit din nou în glucoză în procesul de gluconeogeneză.

2) Piruvat $\xrightarrow{\text{PDH}}$ acetil CoA

Reacţia este ireversibilă şi se produce în mitocondrii. Enzima piruvat dehidrogenază catalizează această reacţie al cărui produs este Acetil CoA. Acetil CoA poate intra în ciclul acidului citric, unde este metabolizată mai departe pentru a produce energie adiţională, sau este folosită ca substrat pentru sinteza acizilor graşi.

3) Piruvat $\xrightarrow{\text{alanin-aminotransferază}}$ alanina

Reacţia este reversibilă şi leagă metabolismul carbohidraţilor de metabolismul aminoacizilor. Reacţia este catalizată de alanin-aminotransferaza, iar produsul, aminoacidul alanină, este un component al proteinelor.

4) În drojdie şi alte microorganisme inferioare, piruvatul poate fi convertit în etanol. În prima etapă piruvatul este decarboxilat.

Piruvat + $H^+ \rightarrow$ acetaldehida + CO_2

Această reacţie este catalizată de piruvat decarboxilaza, care conţine drept coenzimă tiamin-pirofosfatul (TPP) (coenzima multor enzime).

A doua etapă este reducerea acetaldehidei la etanol de către NADH într-o reacţie catalizată de alcool dehidrogenază.

Acetaldehida + NADH + $H^+ \rightleftarrows$ etanol + NAD^+

Centrul activ al alcool dehidrogenazei conţine un ion de Zn^{2+}, care este legat la 2 atomi de sulf în 2 reziduuri, cisteină şi un N al histidinei. Ca şi în carboxipeptidaza A, Zn^{2+} polarizează grupul carboxil al substratului pentru a-l stabiliza. Conversia glucozei în alcool se numeşte fermentaţie alcoolică. Rezultatul net al acestui proces anaerobic este:

Glucoza + $2P_i$ + 2ADP + $2H^+ \rightarrow$ 2 etanol + $2CO_2$ + 2ADP + $2H_2O$

Este important de observat faptul că NAD^+ şi NADH nu apar în această

ecuaţie. Acetaldehida este redusă la etanol aşa încât NAD+ este regenerat pentru a fi folosit în reacţia catalizată de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. De altfel, conversia glucozei în alcool nu este o reacţie de oxido-reducere netă.

În conversia anaerobică a glucozei în lactat sau etanol este eliberată numai o mică parte de energie. Mult mai multă energie poate fi obţinută din calea aerobică a acidului citric şi din lanţul de transport de electroni.

Punctul de intrare în această cale oxidativă este acetil CoA, care se formează în interiorul mitocondriei prin decarboxilarea oxidativă a piruvatului.

Piruvat + NAD^+ + CoA → acetil CoA + CO_2 + NADH

Reacţia este catalizată de complexul enzimatic al piruvat dehidrogenazei.

NAD^+ necesar pentru această reacţie şi pentru oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului este regenerat când NADH transportă electronii la O_2 prin lanţul de transport de electroni în mitocondrie.

Producerea de ATP

1. Bilanţul glicolizei anaerobe:

– ATP consumat: 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt folosiţi la formarea F1,6BP.

– ATP produs: 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt produşi prin reacţia fosfoglicerat kinazei; 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt produşi prin reacţia piruvat kinazei.

Numărul total de moli de ATP produşi prin fosforilarea oxidativă a substratului în glicoliza anaerobă este de 2 moli pe molecula de glucoză.

2. Bilanţul glicolizei aerobe:

– ATP consumat: 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt folosiţi pentru a forma $F_{1,6}BP$.

– ATP produs: 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt produşi prin reacţia fosfoglicerat kinazei; 2 moli de ATP pe molecula de glucoză sunt produşi prin reacţia piruvat kinazei; 4 moli ATP pe molecula de glucoză sunt produşi prin NADH format în reacţia G_3PD.

„Naveta" glicerol 3-fosfat are ca rezultat producerea a 2 moli de ATP la o moleculă de NADH. „Naveta" glicerol-3-fosfat oxidează NADH produs în reacţia G_3PD şi aceasta rezolvă problema impermeabilităţii membranei interne a mitocondriei pentru NADH. În citozol G_3PD este o enzimă legată de NAD^+ şi catalizează reducerea DHAP la glicerol 3-fosfat cu transfer de electroni de la NADH.

Glicerol 3-fosfatul intră în mitocondrie şi este oxidat înapoi la DHAP de către G_3PD mitocondrială.

G_3PD mitocondrială este o enzimă legată de flavin-adenin-dinucleotid (FAD) ca acceptor de electroni. Prin oxidarea FAD redus ($FADH_2$) format în reacţie, lanţul mitocondrial de transport de electroni şi fosforilarea oxidativă pot sintetiza 2 moli de ATP pe molecula de NADH.

DHAP format părăseşte mitocondria şi continuă naveta (figura 41).

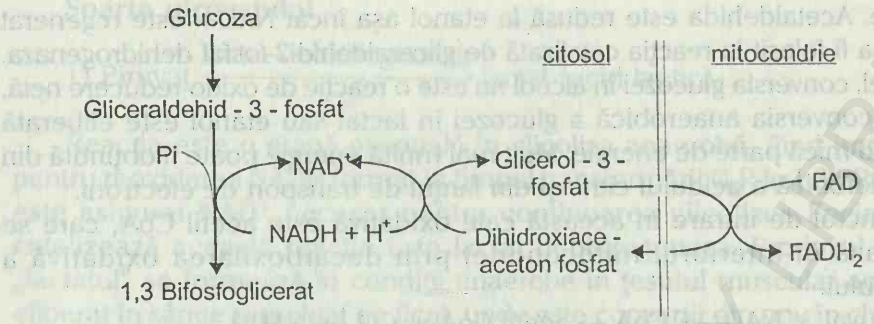


Fig. 41. "Naveta" glicerol-3-fosfat.

3. Numărul total de moli ATP produşi în glicoliza aerobă pe molecula de glucoză este de 6 moli ATP.

Intrarea fructozei în glicoliză

Fructoza este un glucid abundent în alimentaţie. Aportul zilnic este de aproximativ 100 g. De asemenea zahărul (sucroza) este hidrolizat în fructoză şi glucoză. Fructoza intră în circuitul glicolitic prin fructoza-1-fosfat, cea mai

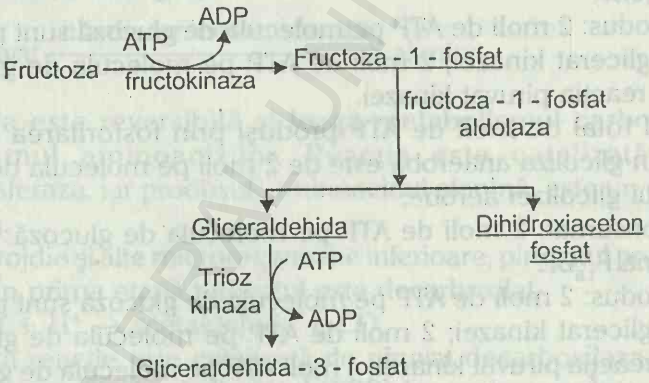


Fig. 42. Metabolizarea fructozei în procesul glicolitic.

mare parte fiind metabolizată în ficat (figura 42).

Prima etapă este fosforilarea fructozei la fructoza-1-fosfat, printr-o reacţie catalizată de fructokinază. Fructoza-1-fosfatul este scindat printr-o clivare aldol, catalizată de o aldolază specifică fructoza-1-fosfat aldolaza, în 2 trioze: gliceraldehida şi dihidroxiaceton fosfatul. Gliceraldehida este apoi fosforilată la gliceraldehid-3-fosfat de către o triozokinază şi astfel poate intra în fluxul glicolitic.

O cale alternativă a metabolizării fructozei este fosforilarea la fructozo-6-fosfat de către hexokinază. Totuşi, afinitatea hexokinazei pentru glucoză este de 20 de ori mai mare decât pentru fructoză. O cantitate mică de fructoză-6-fosfat este formată în ficat, unde este o cantitate mare de glucoză. În ţesutul adipos, însă, este o cantitate mai mare de fructoză decât glucoză, deci formarea fructozo-6-fosfatului nu este inhibată competitiv şi o mare parte de

fructoză din ţesutul adipos este metabolizată prin glucozo-6-fosfat.

Intrarea galactozei în glicoliză

Glucidul din lapte (lactoza) este scindat prin hidroliză de enzima lactază în galactoză şi glucoză. În timpul metabolizării, galactoza este convertită în glucoza-6-fosfat în patru etape.

Prima reacţie în calea interconversiei, galactoză-glucoză, este fosforilarea galactozei la galactoză-1-fosfat.

$$\text{Galactoza} + \text{ATP} \rightarrow \text{galactoză-1-fosfat} + \text{ADP} + H^+$$

Galactoza-1-fosfat primeşte o grupare uridil de la uridin difosfat glucoza (UDP - glucoza), un intermediar în sinteza legăturii glicozidice. În urma acestei reacţii catalizate de enzima galactoza-1-fosfat uridil transferaza rezultă UDP - galactoză şi glucoză-1-fosfat. Galactoza este apoi epimerizată la glucoză în timpul ataşării la UDP.

Produsul final al reacţiilor catalizate de galactokinază, transferază şi epimerază este glucozo-1-fosfatul. G_1P este izomerizat la G_6P de fosfoglucomutaza. UDP - glucoza nu este consumată în timpul conversiei galactozei în glucoză, deoarece este regenerată din UDP - galactoză de către epimerază. Această reacţie este reversibilă şi produsul direcţiei inverse este de asemenea important.

Conversia UDP - glucozei în UDP - galactoză este esenţială pentru sinteza reziduurilor galactozil în complexele polizaharide şi glicoproteine, atunci când cantitatea de galactoză din dietă nu este adecvată pentru a acoperi aceste necesităţi.

Galactoza este un produs toxic. Lipsa enzimei galactozo-1-fosfat uridil transferaza produce o boală severă, galactozemia, care este transmisă ereditar ca o trăsătură autosomală recesivă. La persoanele care suferă de galactozemie, metabolismul galactozei este blocat la galactozo-1-fosfat. Copiii atinşi de această boală au ficatul mărit şi de obicei icter. Când bolnavul consumă lapte se produce vomă sau diaree; foarte mulţi au retard mintal. Galactoza din sânge este mult crescută şi de asemenea ea este prezentă şi în urină. Criteriul de diagnostic este absenţa enzimei galactozo-1-fosfat uridil - transferaza din hematii. Galactozemia este tratată prin excluderea galactozei din dietă. Dereglarea este produsă nu atât de absenţa unor compuşi esenţiali, cât de acumularea substanţelor toxice. Bolnavii pot să sintetizeze UDP - galactoza din UDP - glucoza, deoarece activitatea epimerazei este normală. Una dintre substanţele toxice este galactitolul, care este format prin reducerea galactozei. Prezenţa unei reductaze în cristalin favorizează acumularea galactitolului şi duce la formarea cataractei.

Glicoliza în hematii

Eritrocitele mature nu au mitocondrii, aşa încât ele sunt total dependente de glicoliză pentru producerea de ATP. ATP este solicitat pentru activitatea ATP-azei care stimulează sistemul de transport de ioni de sodiu şi potasiu, necesar pentru a menţine forma biconcavă corespunzătoare a membranei hematiei. Bolile asociate cu defectele enzimatice din calea glicolitică sunt descrise în continuare.

1. *Deficitul de piruvat kinază.* Defecte genetice: piruvat kinaza există sub formă de izoenzime, iar defectele genetice ale subunităţilor din izoenzimă pot afecta selectiv enzimele glicolitice ale hematiilor. Orice defect în enzimele glicolitice (ex: piruvat kinaza) nu mai permite o producţie adecvată de ATP şi în consecinţă reduce activitatea ATP-azei, necesară activităţii pompei de ioni, descreşte stabilitatea hematiilor, produce umflarea lor şi liza. Anemia hemolitică este termenul pentru distrugerea excesivă şi prematură a hematiilor. Cel mai comun defect în glicoliză, care produce anemia hemolitică, este deficienţa piruvat-kinazei.

2. *Deficitul de hexokinază* reduce, în ultimă instanţă, cantitatea de oxigen necesară ţesuturilor. Bolnavii au un defect genetic în izoenzimele hexokinazei care se găsesc în hematii. Deoarece hexokinaza este prima enzimă în glicoliză, hematiile acestor pacienţi au o cantitate mică de intermediari glicolitici (1,3 BPG, precursorul 2,3 BPG). 2,3 BPG se leagă la hemoglobină şi scade afinitatea acesteia pentru oxigen. Aceasta permite în mod normal hemoglobinei să elibereze oxigen în ţesuturile capilare. În consecinţă, hemoglobina acestor bolnavi cu nivel mic de 2,3 BPG are o afinitate anormal de mare pentru oxigen. Curba saturării cu oxigen a eritrocitelor de la pacienţii cu deficienţă de hexokinază este deviată la stânga şi indică faptul că oxigenul este mai puţin disponibil pentru ţesuturi. Acest defect are ca rezultat anemia hemolitică.

3. *Acidoza lactică.* Valoarea normală a lactatului în sânge este mai mică de 1,2 mM. În acidoza lactică valoarea lactatului poate fi de 5 mM sau mai mult. O concentraţie mare de lactat în sânge poate avea ca rezultat scăderea pH-ului şi a nivelului de bicarbonaţi. Cantitatea mare de lactat în circuitul sanguin poate fi rezultatul sintezei mărite sau a scăderii utilizării lactatului. Anoxia sau lipsa oxigenului este o cauză obişnuită a cantităţii mari de lactat în sânge. Criza de oxigen reduce producţia mitocondrială de ATP şi în consecinţă activarea PFK, deci creşterea glicolizei şi a producţiei de lactat. Utilizarea lactatului în ţesuturi este redusă, deoarece este solicitat oxigenul în utilizarea lactatului ca sursă de energie (pentru oxidarea mitocondrială a acetil CoA). Anoxia tisulară poate produce o slăbire a fluxului sanguin şi o anemie severă.

Privire de ansamblu asupra glicolizei

Glicoliza este un set de reacţii prin care glucoza este convertită în piruvat. În organismele aerobe, glicoliza precede ciclul acidului citric şi lanţul transportului de electroni, unde este obţinută cea mai mare parte din energia eliberată din glucoză. O mare parte a reacţiilor au loc în citozol.

– În prima etapă glucoza este convertită în fructoza 1,6 - bifosfat printr-un lanţ de 3 reacţii succesive: o fosforilare, o izomerizare şi a doua reacţie de fosforilare. În această etapă sunt consumate două molecule de ATP pe molecula de glucoză. Reacţia este preludiul sintezei de ATP.

– În a doua etapă fructoza - 1,6 - bifosfatul este clivat de aldolază în dihidroxiaceton-fosfat şi gliceraldehid-3-fosfat, care sunt uşor inconvertibile. Glicerid 3-fosfatul este apoi oxidat şi fosforilat pentru a forma 1,3 BPG, un

acil fosfat cu un potenţial de transfer fosfat mare. Se formează 3-fosfogliceratul şi este generat 1 mol de ATP.

– În ultimul stadiu al glicolizei se produce fosfoenolpiruvatul, un al doilea intermediar cu potenţial de transfer mare, printr-o schimbare a unei grupări fosforil şi o deshidratare. O a doua moleculă de ATP este generată atunci când fosfoenolpiruvatul este convertit în piruvat. Deci: câştigul net este de 2 molecule de ATP prin formarea a 2 molecule de piruvat de la o moleculă de glucoză.

Acceptorul de electroni în oxidarea glicerid-3-fosfatului este NAD^+ care trebuie să fie regenerat pentru ca glicoliza să poată continua. În organismele aerobe, NADH format în cursul glicolizei transferă electronii la O_2 prin lanţul de transport de electroni şi este regenerat NAD^+. În condiţii de anaerobioză NAD^+ este regenerat prin reducerea piruvatului la lactat. În multe microorganisme NAD^+ este regenerat prin sinteza lactatului sau etanolului din piruvat. Acestea sunt procese de fermentaţie.

Calea glicolitică are un dublu rol: să degradeze glucoza pentru a genera ATP; să furnizeze elementele necesare pentru sinteza componentelor celulare. Rata de conversie a glucozei în piruvat este reglată pentru a acoperi aceste două nevoi celulare majore.

În condiţii fiziologice, reacţiile din glicoliză sunt uşor reversibile cu excepţia celor catalizate de hexokinază, fosfofructokinază şi piruvatkinază.

Cel mai important element de control al glicolizei este fosfofructokinaza care este inhibată de concentraţia mare de ATP şi citrat şi este activată de AMP şi fructoza 2,6 bifosfat. În ficat, 2,6 bifosfatul semnalează că glucoza este abundentă. Fosfofructokinaza este activă când apar nevoi fie de energie, fie de elemente de sinteză. Hexokinaza este inhibată de glucoza-6-fosfat, care se acumulează când fosfofructokinaza este inactivă. Piruvatkinaza, alt centru de control, este inhibată alosteric de ATP şi alanină şi este activată de fructoza 1,6-bifosfat, deci piruvatkinaza este maximum activată când schimbul energetic este mic şi se acumulează compuşi intermediari. Piruvatkinaza, ca şi setul de enzime care controlează nivelul fructozo 2,6 - bifosfatului, este reglată prin fosforilare reversibilă. Un nivel scăzut de glucoză în sânge iniţiază fosforilarea piruvatkinazei în ficat, care îi scade activitatea şi astfel descreşte consumul de glucoză în ficat. În condiţii fiziologice normale, toţi aceşti factori contribuie la menţinerea glicemiei în limite normale.

Reglarea glicemiei

În condiţii de post, nivelul glucozei din sânge este menţinut constant prin antrenarea rezervei de glicogen din ficat. Într-o cantitate mai mică poate proveni şi din rinichi. Ambele organe (ficat şi rinichi) conţin o enzimă specifică, glucozo-6-fosfataza, necesară pentru conversia glucozo-6-fosfatului în glucoză. Muşchiul scheletic, deşi stochează glicogenul, nu conţine această enzimă şi nu poate contribui direct la nivelul glucozei din sânge. Când aceasta creşte de obicei prin absorbţia glucidelor din intestin, glicogenoliza este înlocuită de glicogeneză, iar excesul de glucoză din sânge este convertit în ficat şi muşchi în glicogen.

Un număr de hormoni sunt implicaţi în reglarea concentraţiei de glucoză din sânge.

Insulina produsă de celulele ß din insulele Langerhans din pancreas, favorizează glicogeneza şi lipogeneza (formarea grăsimilor din glucide) având ca rezultat descreşterea concentraţiei de glucoză în sânge. Altă acţiune importantă a insulinei este creşterea permeabilităţii celulelor pentru glucoză. În caz de deficienţă a insulinei (diabet) nivelul glucozei sanguine tinde să crească după masa şi corpul are o capacitate mai mică să metabolizeze glucidele (hiperglicemie). La cealaltă extremă insulele de celule tumorale pot produce un exces de insulină şi în consecinţă o scădere foarte mare a glucozei din sânge (hipoglicemie).

Hormonul de creştere şi hormonul adrenocorticotrop (ACTH) sunt secretaţi de glanda pituitară anterioară. Ambii hormoni au o acţiune antagonistă asupra insulinei şi tind să crească nivelul glucozei sanguine.

Hidrocortizonul şi alţi 11-oxisteroizi secretaţi de corticosuprarenală stimulează gluconeogeneza. Efectul ACTH este probabil mediat de acţiunea sa asupra corticosuprarenalei pentru a stimula producerea de 11-oxisteroizi. Deoarece 11-oxisteroizii tind să crească nivelul glucozei în sânge şi sunt antagoniştii insulinei, ei sunt consideraţi uneori ca hormoni diabetogeni.

Bolnavii cu sindrom Cushing au o supraproducţie de steroizi datorită tumorii sau hiperplaziei corticosuprarenalei şi aceşti bolnavi tind să aibă hiperglicemie. Din contră, bolnavii cu boala Addison, au o insuficienţă corticosuprarenală şi au o hipoglicemie moderată.

Epinefrina secretată de medulosuprarenală stimulează glicogenoliza având ca rezultat creşterea cantităţii de glucoză în sânge. *Stress*-ul produce creşterea epinefrinei şi o creştere imediată a producerii de glucoză, ca răspuns la solicitarea de energie.

Glucagonul secretat de celulele alfa din pancreas creşte de asemenea nivelul glucozei sanguine prin stimularea glicogenolizei hepatice. Glucagonul nu are efect asupra glicogenului din muşchi, de aceea nu se observă o creştere a lactatului şi a piruvatului din sânge după administrarea lui.

Tiroxina secretată de tiroidă pare de asemenea să stimuleze glicogenoliza şi creşte rata de absorbţie a glucozei din intestin.

4.2.2. Piruvat dehidrogenaza și ciclul acidului citric

În calea glicolitică glucoza este convertită la piruvat. Următoarea etapă pentru generarea energiei conţinute în molecula de glucoză, are loc în condiţii de aerobioză şi este decarboxilarea oxidativă a piruvatului cu formarea acetil coenzimei A (acetil CoA). Unitatea acetil activată este apoi complet oxidată la CO_2 în ciclul acidului citric, care constă dintr-o serie de reacţii cunoscute de asemenea ca *ciclul acidului tricarboxilic sau ciclul Krebs*. Ciclul acidului citric este în ultimă instanţă calea comună pentru oxidarea tuturor

moleculelor care participă la asigurarea energiei necesare bunei funcţionări a organismului: aminoacizi, acizi graşi liberi, corpi cetonici şi glucide. Mare parte din acest „combustibil molecular" intră în ciclu ca acetil CoA. De asemenea ciclul furnizează material pentru biosinteză.

La eucariote, reacţiile din ciclul acidului citric se produc în mitocondrii, spre deosebire de cele ale glicolizei, care se produc în citozol.

Decarboxilarea oxidativă a piruvatului pentru a forma acetil CoA, care se produce în matricea mitocondrială, este reacţia de legătură între glicoliză şi ciclul acidului citric.

Piruvat + CoA + NAD^+ → acetil CoA + CO_2 + NADH

Această ardere ireversibilă a produsului glicolizei (piruvatul) în ciclul acidului citric este catalizată de complexul enzimatic al piruvat dehidrogenazei (PDH), un complex multienzimatic.

Funcţia PDH: furnizează o legătură între glicoliză şi ciclul acidului citric. PDH oxidează piruvatul format prin glicoliză la CO_2 şi acetil coenzima A (acetil CoA) care este substratul pentru ciclul acidului citric.

Complexul enzimatic al piruvat dehidrogenazei este localizat în matricea mitocondrială şi este un ansamblu de trei feluri de enzime: piruvat dehidrogenaza (E_1), cu gruparea prostetică TPP, catalizează reacţia de decarboxilare oxidativă a piruvatului; dihidrolipoil transacetilaza (E_2), care are gruparea prostetică lipoamida, catalizează transferul de grupare acetil la CoA; dihidrolipoil dehidrogenaza (E_3), a cărei grupare prostetică este FAD, catalizează regenerarea formei oxidate a lipoamidei.

În conversia piruvatului la acetil CoA sunt asociate patru reacţii enzimatice distincte, fiecare etapă solicitând diferite subunităţi ale enzimei şi cofactori diferiţi.

– În prima etapă piruvatul este decarboxilat după combinarea lui cu TPP. Această reacţie este catalizată de piruvat dehidrogenază (E_1) componentă a complexului multienzimatic.

Piruvat + TPP → hidroxietil TPP + CO_2

– În etapa a doua, grupul hidroxietil ataşat la TPP este oxidat pentru a forma grupare acetil, care este transferată la lipoamidă. În această reacţie, oxidantul este gruparea disulfid a lipoamidei, care este convertită într-o formă sulfhidril. Reacţia este catalizată de asemenea de o componentă a piruvat dehidrogenazei (E_2) şi duce la formarea acetillipoamidei.

– În etapa următoare, gruparea acetil este transferată de la acetillipoamidă la coenzima A, pentru a forma acetil CoA. Reacţia este catalizată de enzima dihidrolipoil transacetilaza.

Legătura tioester înalt energetică este conservată în gruparea acetil şi este transferată la CoA.

– În faza finală, forma oxidată a lipoamidei este regenerată de dihidrolipoid dehidrogenază (E_3). Un ion hidro este transferat la gruparea prostetică FAD a enzimei şi apoi la NAD^+.

Studiile ce au permis analiza structurii şi asamblării complexului piruvat dehidrogenazei au fost făcute de Lester Reed pe E. Coli. Studii ulterioare de

microscopie electronică au arătat că masa complexului este de aprox. 1600 Kd şi constă din 60 de lanţuri polipeptidice.

La pH alcalin complexul se disociază în componentul piruvat dehidrogenază şi un subcomplex ce conţine celelalte două enzime. Transacetilaza poate fi izolată apoi la pH neutru în prezenţa ureei. Cele trei enzime se reasociază spontan pentru a forma complexul piruvat dehidrogenază atunci când sunt amestecate la pH neutru, în absenţa ureei, fapt ce sugerează formarea complexului printr-un proces de autoasamblare. Această integrare structurală a trei feluri diferite de enzime, face posibilă coordonarea catalizei unei reacţii complexe. Toţi produşii intermediari din decarboxilarea oxidativă a piruvatului sunt strâns legaţi de complex. Apropierea strânsă a unei enzime de alta creşte rata totală a reacţiei şi micşorează sediul reacţiilor. Intermediarii activaţi sunt transportaţi de la un centru la altul prin lipoamidă (gruparea prostetică a transacetilazei). Ataşarea grupării lipoil la grupul-amino al reziduului lizină de pe transacetilază dă flexibilitate inelului respectiv. Această grupare cu greutate moleculară de 14 A face posibil ca nucleul lipoil al subunităţii de transacetilază să interacţioneze cu unitatea tiamino-pirofosfat al unei subunităţi adiacente şi cu unitatea flavin a unei dihidrolipoil dehidrogenaze adiacente. Mai mult, un nucleu lipoil al complexului multienzimatic poate interacţiona cu altul, formând o reţea de interacţii ale grupărilor reactive.

Încărcătura netă a nucleului lipoil în timpul ciclului este 0, -1 sau -2, dacă grupele sulfhidril sunt total ionizate. Această schimbare în încărcătură poate furniza energie pentru dirijarea direcţiei de acţionare a grupului lipoil.

Reglarea activităţii piruvat dehidrogenazei

1. Inhibitori: acetil CoA şi NADH.

2. Pentru ca să funcţioneze complexul, trebuie să fie prezentă o concentraţie adecvată de CoA şi de NAD^+ ca acceptori de molecule.

3. Modificări covalente (figura 43):

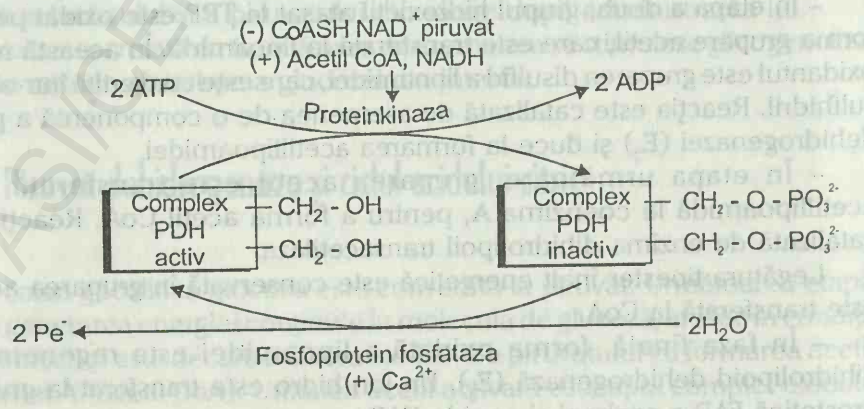


Fig. 43. Modificările covalente implicate în controlul complexului piruvat dehidrogenaza (PDH).

a) PDH există în 2 forme: inactivă (fosforilată) şi activă (defosforilată).

b) O proteinkinază care este slab legată de complexul enzimatic produce forma inactivă. Proteinkinaza, o enzimă dependentă de Mg^{2+} şi ATP, fosforilează un reziduu serină al decarboxilazei (subunitateaPDH).

c) Reactivarea complexului este produsă de defosforilarea de către o fosfoprotein-fosfatază.

d) Reglarea complexului enzimatic PDH este îndeplinită cu mijloacele specifice ale proteinkinazei şi fosfoprotein-fosfatazei.

– Reglarea proteinkinazei: Acetil CoA şi NADH stimulează reacţia proteinkinazei, în timp ce CoA (CoASH) şi NAD^+ o inhibă ca şi piruvatul, substratul complexului PDH.

– Reglarea fosfoprotein-fosfatazei: fosfoprotein-fosfataza este activată prin creşterea concentraţiei de calciu în mitocondrie, care se produce când sistemul este lipsit de ATP.

e) Insulina poate activa (printr-un mecanism necunoscut) PDH în ţesutul adipos, aşa cum o fac catecolaminele în ţesutul muşchiului cardiac (figura 44).

Defectele genetice ale PDH

Un deficit în oricare din subunităţile proteice ale PDH poate duce la o descreştere sau pierdere completă a activităţii enzimei. Cazurile severe sunt fatale.

Unele simptome sunt: acidoza lactică şi deteriorarea neurologică.

Administrarea unei cantităţi mari de tiamină (vit. B_1) poate fi eficientă pentru defectele în E_1, care reduce afinitatea enzimei pentru TPP.

Administrarea unei doze mari de acid lipoic poate fi eficientă pentru defectele în E_2, care reduc afinitatea pentru acel compus.

O dietă cetogenică bogată în grăsimi şi săracă în glucide ajută la scăderea cantităţii de piruvat şi a lactatului care se formează din excesul de piruvat.

Beri-Beri, o boală cu manifestări neurologice şi cardio-vasculare, este produsă de un deficit de tiamină (vit. B_1). Boala a fost descrisă ca un deficit de vitamina B_1 încă din anul 1630 de către Jacob Bonitus, un medic olandez care lucra în Java. Locuitorii o numeau Beri-Beri (care înseamnă oaie) pentru că boala se caracterizează prin deteriorări ale sistemului nervos periferic, dureri în membre, slăbiciune musculară (mers de oaie). Manifestarea cardiacă poate consta în ritm inadecvat. Produsul biochimic poate fi afectat de deficienţa tiaminei, deoarece TPP este gruparea prostetică a trei enzime importante: piruvat dehidrogenaza, α-cetoglutarat dehidrogenaza şi transcetolaza. Transcetolaza este enzima care transferă două unităţi de carbon de la un zahăr la altul şi are un rol important în calea pentozelor. În Beri-Beri concentraţia piruvatului şi α-cetoglutaratului în sânge este mai mare decât normal, pe când activitatea piruvat şi-cetoglutarat dehidrogenazei este scăzută. Activitatea scăzută a transcetolazei în hematii este un indiciu pentru diagnosticarea bolii.

Ciclul acidului citric

Acesta este o cale amfibolică (se implică atât în procesele anabolice, cât şi în cele catabolice):

– Reacţii anabolice: intermediarii ciclului acidului citric sunt folosiţi ca precursori în biosinteza multor compuşi.

– Reacţii catabolice: ciclul furnizează căile pentru degradarea reziduurilor acetil cu 2 atomi de carbon, ce provin din glucide, acizi graşi şi aminoacizi.

Ciclul acidului citric furnizează o mare parte din energie pentru lanţul respirator. Electronii generaţi din acţiunea ciclului sunt transferaţi la lanţul de transport electronic, unde sunt folosiţi în procesele de fosforilare oxidativă pentru a genera ATP.

Reacţiile ciclului acidului citric (fig. 44):

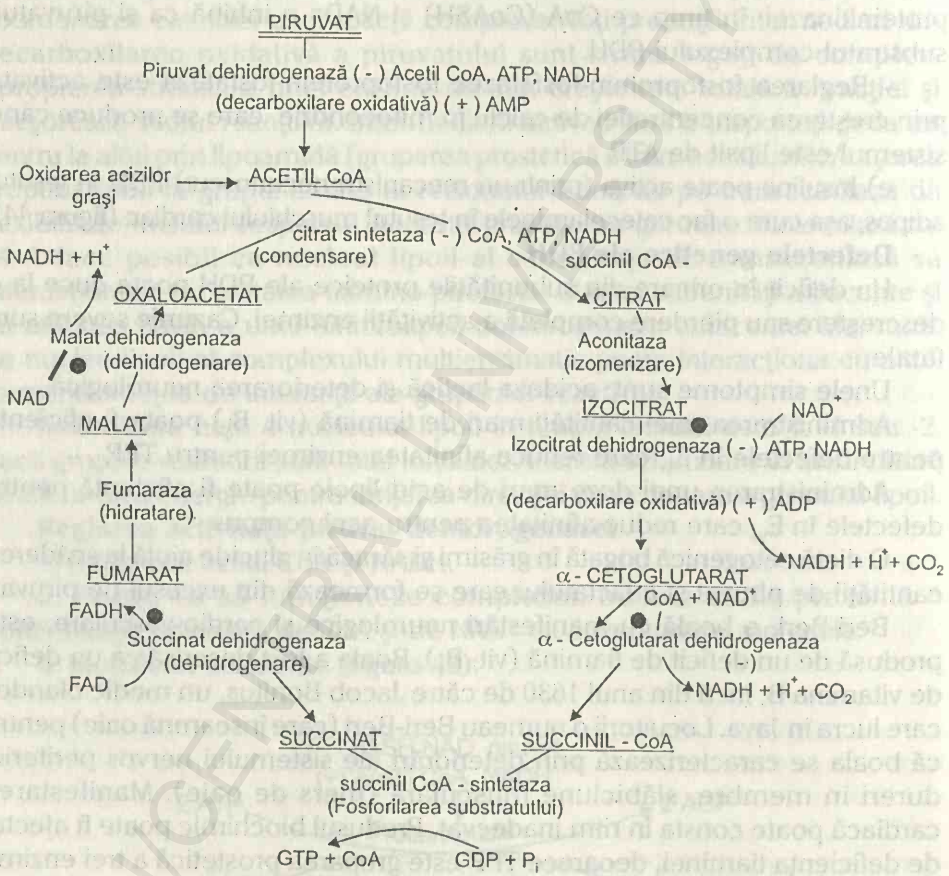


Fig. 44. Reacţiile piruvat dehidrogenazei şi ciclul acidului citric (Ciclul Krebs). Tipul de reacţie catalizată de fiecare enzimă este indicat în paranteză, sub enzime. Inhibitorii şi activatorii enzimelor sunt indicaţi prin (+) şi (-). ADP = adenozin difosfat; AMP = adenozin monofosfat; ATP = adenozin trifosfat; CoA = coenzima A; FAD = flavin adenindinucleotid; $FADH_2$ = FAD redus; GDP = guanozin difosfat; GTP = goanozin trifosfat; NAD^+ = nicotin adenin dinucleotid oxidat; NADH = NAD redus; Pi = fosfor anorganic. Punctele negre indică etapele care solicită un acceptor de electroni NAD şi FAD care este regenerat în lanţul respirator.

1. Oxaloacetatul condensează cu acetil coenzima A pentru a forma citrat şi CoA. Reacţia iniţială este catalizată de enzima citrat sintaza numită iniţial enzima de condensare aldolică. Reacţia este de condensare, deoarece implică unirea a două molecule (de obicei cu eliberarea unei molecule mici ca molecula de H_2O, sau în acest caz de CO_2). Oxal acetatul condensează întâi cu acetil CoA pentru a forma citril CoA, care este apoi hidrolizată în citrat şi CoA. Hidroliza citril CoA, impulsionează reacţia în direcţia sintezei de citrat. Inhibitorii reacţiei sunt: ATP, NAD şi succinil CoA.

2. Citratul este izomerizat în izocitrat. Reacţia este catalizată de enzima – aconitaza – deoarece cis-aconitatul este un intermediar. Enzima conţine în structură 4 atomi de Fe, care nu sunt legaţi într-un grup hem, ci sunt complexaţi cu 4 atomi de sulfit anorganic şi 4 atomi de sulfură de cisteină. Reacţia este o izomerizare a citratului în izocitrat, pentru a face posibilă decarboxilarea oxidativă a unităţii cu 6 atomi de C. Izomerizarea citratului este realizată printr-o reacţie de deshidratare urmată de o etapă de hidratare. Rezultatul este interschimbarea unui atom de H cu un OH.

3. Izocitratul este oxidat şi decarboxilat pentru a forma α-cetoglutarat şi CO_2. Molecula de NAD^+ este redusă la NADH.

$$\text{Izocitrat} + NAD^+ \rightleftarrows \alpha\text{-cetoglutarat} + CO_2 + NADH$$

Produsul intermediar al reacţiei este oxalosuccinatul, un compus instabil β-cetoacid. Reacţia este inhibată de ATP şi NAD şi este activată de ADP.

4. Prin decarboxilare oxidativă a α-cetoglutaratului se formează Succinil - coenzima A:

$$\alpha\text{- ketoglutarat} + NAD^+ + CoA \rightarrow \text{succinil CoA} + NAD + H^+$$

Reacţia este catalizată de complexul α-cetoglutarat dehidrogenaza. Mecanismul reacţiei este similar cu cel al conversiei piruvatului în acetil CoA de către piruvat dehidrogenază (de fapt subunităţile E_3 sunt identice cu cele ale PDH). Aceiaşi cofactori participă la formarea complexului: TPP, lipoamida, CoA, FAD şi NAD^+. Produsul este succinil CoA, un tioester bogat în energie, compus similar cu acetil CoA şi cu ATP. Inhibitorii reacţiei sunt: ATP, NADH, succinil CoA.

5. Succinil CoA este un tioester înalt energetic. Clivarea legăturii tioester a succinil CoA este cuplată cu fosforilarea guanozin - difosfatului (GDP). Este o reacţie de fosforilare a substratului cu conservarea energiei sub formă de GTP (guanozin trifosfat) care poate fi convertit la ATP de către enzima nucleozid difosfatkinaza.

$$\text{succinil CoA} + P_i + GDP \rightleftarrows \text{succinat} + GTP + CoA$$

$$GTP + ADP \rightleftarrows GDP + ATP$$

Reacţia de transformare a succinil CoA în succinat este reversibilă şi este catalizată de succinil CoA sintetaza.

6. Regenerarea oxalacetatului prin oxidarea succinatului. Reacţiile compuşilor cu patru atomi de carbon constituie stadiul final al ciclului acidului citric. Succinatul este convertit în oxaloacetat în trei etape: o oxidare, o hidratare şi a doua oxidare. Oxalacetatul este regenerat şi energia este stocată sub formă de $FADH_2$ şi NADH. Succinatul este oxidat la fumarat de succinat dehidrogenază. Acceptorul de H^+ în această reacţie este FAD deoarece schimbul de energie liberă este insuficient pentru a reduce NAD^+. Succinat dehidrogenaza, ca şi aconitaza este o proteină Fe - S. Are trei tipuri SDH face parte integrantă din membrana internă a mitocondriei. Succinat dehidrogenaza este legată direct de lanţul de transport de electroni. Este o reacţie de hidrogenare în timpul căreia FAD este redus la $FADH_2$, iar $FADH_2$ este reoxidat prin transferul de electroni direct la lanţul de transport de electroni al membranei mitocondriale. Ultimul acceptor al acestor electroni este oxigenul molecular.

Etapa următoare, fumarat → malat, este o reacţie de hidratare în care apa este adăugată la locul dublei legături a fumaratului. Reacţia este catalizată de enzima fumaraza.

Ultima etapă a ciclului este o reacţie de dehidrogenare a malatului pentru a forma oxaloacetatul. Această reacţie în care NAD^+ este redus la NADH, este catalizată de enzima malat dehidrogenaza.

$$\text{Malat} + NAD^+ \rightleftarrows \text{oxaloacetat} + NADH + H^+$$

Reglarea ciclului acidului citric

Ritmul ciclului acidului citric este precis adaptat pentru a putea acoperi nevoia de ATP a celulelor. Sunt importante şi semnalele NAD^+ şi FAD când schimbul de energie este mic.

Sinteza citratului de la oxaloacetat şi acetil CoA este un punct de control important în ciclu. ATP este un inhibitor alosteric al citrat sintazei. Efectul ATP este creşterea K_M pentru acetil CoA; deoarece concentraţia de ATP creşte, mai puţină enzimă (citrat sintaza) este saturată cu acetil CoA şi astfel este produs mai puţin citrat.

Al doilea punct de control este izocitrat dehidrogenaza. Enzima este stimulată alosteric de ADP, care îi măreşte afinitatea pentru substrat (legarea izocitratului, NAD^+, Mg^{2+} şi ADP este cooperantă). În contrast, NADH inhibă izocitrat dehidrogenaza prin îndepărtarea directă a NAD^+. Alt inhibitor este ATP.

Al treilea centru de control este α-cetoglutarat dehidrogenaza. Unele aspecte ale controlului acesteia sunt asemănătoare cu cele ale complexului piruvat dehidrogenazei; α-cetoglutarat dehidrogenaza este inhibat de succinil CoA şi NADH, produşii reacţiei catalizate de complexul enzimatic al α-cetoglutarat dehidrogenazei.

Pe scurt: arderile fragmentelor de doi carboni în ciclul acidului citric şi ritmul arderilor în acest ciclu sunt reduse când celula are o cantitate mare de ATP. Acest control este realizat printr-o varietate de mecanisme complementare în multe puncte de control.

Ciclul acidului citric este calea majoră de „ardere" a moleculelor biologice având ca scop generarea de ATP. Ciclul acidului citric furnizează de asemenea intermediari pentru biosinteză. De ex: majoritatea atomilor de carbon din porfirine provin de la succinil - CoA. Mulţi aminoacizi sunt derivaţi de la α- cetoglutarat şi oxaloacetat. Important este ca intermediarii ciclului acidului citric consumaţi să fie înlocuiţi. Ex: dacă nu este format din nou oxaloacetat, ciclul acidului citric ar înceta în funcţioneze, deoarece acetil CoA nu poate intra în ciclu fără condensarea cu oxaloacetatul. Să presupunem de ex. că oxaloacetatul este convertit în aminoacizi pentru sinteza de proteine. Ciclul acidului citric ar înceta să continue fără formarea unui nou oxaloacetat. Chiar atunci când oxaloacetatul este folosit catalitic, trebuie să fie menţinut un nivel minim pentru ca ciclul să funcţioneze.

Cum este înlocuit oxaloacetatul? Mamiferelor le lipseşte echipamentul enzimatic pentru transformarea acetil CoA direct în oxaloacetat sau alt intermediar al ciclului acidului citric, dar oxaloacetatul este format prin carboxilarea piruvatului într-o reacţie catalizată de piruvat carboxilaza. Carboxilarea piruvatului este un exemplu de reacţie „anaplerotică" (de la grec. „*a umple*"). Alte exemple de reacţii anaplerotice sunt:

a) transaminazele din metabolismul aminoacizilor, care furnizează oxaloacetatul;

b) transaminazele care formează α-cetoglutaratul, alt intermediar din ciclul acidului citric;

c) glutamat - dehidrogenaza furnizează de asemenea α- cetoglutarat prin următoarea reacţie:

$$\text{Glutamat} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{glutamat dehidrogenaza}} \alpha\text{-cetoglutarat} + NADH + H_2O + NH_3$$

Scurt istoric al descoperirii ciclului acidului citric. Hans Krebs a ajuns să descifreze această cale metabolică importantă, studiind (într-o perioadă de 5 ani, începând cu anul 1932) rata de oxidare a diferiţilor compuşi pe secţiuni de rinichi şi ficat. Substanţele alese au fost cele care ar fi putut fi intermediari în cursul procesului de oxidare a produselor alimentare. Ideea dinaintea experimentului a fost aceea că produşii intermediari ar putea fi oxidaţi rapid şi de aceea identificaţi. Descoperirea importantă a fost că citratul, succinatul, fumaratul şi acetatul au fost oxidaţi foarte rapid în diferite ţesuturi. O contribuţie importantă a avut-o Albert Szent-Györgyi, în 1935. El a studiat oxidarea diferitelor substanţe prin suspendarea unor secţiuni subţiri din muşchiul pieptului de porumbel. Acest muşchi foarte activ în timpul zborului are o rată de oxidare foarte mare, fapt ce uşurează studiile experimentale. Szent-Györgyi a găsit că adăugarea unor acizi C_4 - dicarboxilici duce la creşterea consumului de oxigen mai mult decât dacă aceasta ar fi produsă prin oxidare directă. Stimularea catalitică a respiraţiei a fost obţinută cu succinat, fumarat şi malat. Următorul pas important a fost elucidarea căii biologice de oxidare a citratului de către Carl Martius şi Franz Knoop în 1937.

Ei au arătat că citratul este izomerizat la izocitrat pe calea cis-aconitatului şi că izocitratul prin decarboxilare oxidativă produce α- cetoglutarat. Se ştie faptul că α- cetoglutarat poate fi oxidat la succinat. Deci, ei au descoperit calea de la citrat la succinat. Aceste descoperiri i-au permis lui Krebs să interpreteze observaţia că citratul măreşte catalitic respiraţia secţiunilor de muşchi.

Informaţii adiţionale au fost obţinute prin folosirea malonatului, un inhibitor specific al succinat dehidrogenazei. Malonatul este un inhibitor competitiv al succinat dehidrogenazei din cauza marei asemănări structurale cu succinatul. Din aceste experienţe, Krebs a dedus că succinat - dehidrogenaza joacă un rol cheie în respiraţie. Acest fapt a fost confirmat de observaţia că succinatul se acumulează când a fost adăugat citrat la muşchiul otrăvit cu malonat (se cunoştea faptul că malonatul otrăveşte respiraţia). De asemenea, succinatul se acumulează atunci când a fost adăugat fumarat la muşchiul otrăvit cu malonat. Primul experiment a arătat importanţa fiziologică a căii metabolice de la citrat la succinat. Al doilea experiment, a arătat că de la fumarat la succinat este o cale distinctă de reacţie catalizată de succinat dehidrogenaza. Krebs a descoperit că citratul se formează cu uşurinţă dintr-o suspensie de muşchi, dacă i se adaugă oxalacetat.

Descoperirea sintezei citratului din oxalacetat şi o substanţă derivată din piruvat sau acetat i-a permis lui Krebs să formuleze schema completă. Acest ciclu al acidului tricarboxilic postulat de Krebs, furnizează o imagine completă a modului în care sunt oxidate glucidele. (Acesta nu este singurul ciclu metabolic descoperit de Krebs. Cu 6 ani înainte, el a constatat că ureea este sintetizată într-un ciclu metabolic numit „Calea ornitinei").

Concluzii

Ciclul acidului citric este calea finală comună pentru oxidarea „combustibilului" molecular. El serveşte de asemenea ca sursă de material pentru procesul de biosinteză.

Numeroase molecule de origini variate intră în ciclu ca acetil CoA. Legătura dintre glicoliză şi ciclul acidului citric este decarboxilarea piruvatului pentru a forma acetil CoA. La eucariote, această reacţie şi cele ale ciclului se produc în interiorul mitocondriei, spre deosebire de glicoliză care se petrece în citozol.

Ciclul începe cu condensarea oxaloacetatului şi acetil-CoA pentru a forma citratul, care este izomerizat la izocitrat. Decarboxilarea oxidativă a acestui intermediar dă α- cetoglutaratul. În următoarea reacţie este eliminată a doua moleculă de CO_2 în care α- cetoglutaratul printr-o decarboxilare oxidativă este transformat în succinil-CoA. Legătura tioester a succinatului este clivată de P_i pentru a forma succinat şi concomitent o legătură fosfat înalt energetică sub formă de GTP. Succinatul este oxidat la fumarat, care este apoi hidratat pentru a forma malatul. În sfârşit, malatul este oxidat şi astfel este regenerat oxaloacetatul.

Astfel: 2 atomi de C de la acetil CoA intră în ciclu şi 2 atomi de C părăsesc ciclul sub formă de CO_2 prin decarboxilări succesive, catalizate de izocitrat dehidrogenaza şi α- cetoglutarat dehidrogenaza.

În 4 reacţii de oxido-reducere din ciclu, 3 perechi de electroni sunt transferate la NAD^+ şi o pereche la FAD. Aceşti transportori de electroni sunt oxidaţi în lanţul de transport de electroni pentru a genera 11 molecule de ATP. În plus, o legătură fosfat înalt energetică este formată direct în ciclul acidului citric, deci sunt generate în total 12 legături fosfat înalt energetice, pentru fiecare fragment de doi carboni complet oxidaţi la H_2O şi CO_2.

Ciclul acidului citric funcţionează numai în condiţii aerobice, deoarece solicită un aport de NAD^+ şi FAD. Aceşti acceptori de electroni sunt regeneraţi când NADH şi $FADH_2$ transferă electronii lor la O_2 prin lanţul de transport de electroni, cu producere concomitentă de ATP.

În consecinţă, ritmul ciclului acidului citric depinde de nevoia de ATP a celulelor. Este importantă reglarea a trei enzime din ciclu pentru controlul arderilor. O încărcătură mare de energie scade activitatea citrat sintetazei, izocitrat dehidrogenazei şi α- cetoglutarat dehidrogenazei, care sunt enzime reglatoare.

Formarea ireversibilă a acetil CoA din piruvat este alt punct de reglare important. Activitatea complexului piruvat dehidrogenazei este controlată prin inhibiţia de către produsul reacţiei (reglare *feedback*) şi fosforilare reversibilă. Aceste mecanisme concură fiecare la reducerea ritmului de formare a acetil-CoA, atunci când încărcătura energetică a celulei este mare.

4.2.3. Transportul de electroni în mitocondrie și fosforilarea oxidativă

Lanţul de transport de electroni (lanţul respirator) este calea finală obişnuită la organismele eucariote, prin care electronii proveniţi de la substanţe bogate în energie sunt transferaţi la oxigen. Moleculele de NADH şi $FADH_2$ formate în glicoliză, oxidarea acizilor graşi şi ciclul acidului citric sunt molecule bogate în energie, deoarece conţin o pereche de electroni cu potenţial de transfer mare. Când aceşti electroni sunt cedaţi oxigenului molecular, o cantitate mare de energie este eliberată şi poate fi folosită la generarea de ATP.

Lanţul de transport de electroni constă dintr-o serie de enzime de oxido-reducere foarte bine organizate, ale căror reacţii pot fi reprezentate astfel:

Substanţa redusă A + substanţa oxidată B $\rightleftarrows$ substanţa oxidată A + substanţa redusă B

Este posibil ca mai multe substanţe să folosească o cale comună, pentru că multe din ele sunt oxidate de enzime care folosesc NAD^+ (nicotin amidadenindinucleotid oxidat) sau FAD^+ (flavin adenindinucleotid oxidat) drept cofactori acceptori de electroni.

Fosforilarea oxidativă este procesul în care se formează ATP din electronii transferaţi de la NADH sau $FADH_2$ la O_2 printr-o serie de transportori de electroni (lanţul de transport de electroni). Acesta este sursa majoră de ATP în organismele aerobe. Fosforilarea oxidativă generează 32 din cele 36

de molecule de ATP care sunt formate când glucoza este complet oxidată la CO_2 şi H_2O. Astfel, fosforilarea oxidativă este strâns cuplată cu lanţul transportor de electroni, pentru a forma ATP (adenozin-trifosfatul) din ADP (adenozin difosfatul) şi fosfor anorganic (P_i).

În mitocondriile intacte şi în particulele submitocondriale, transportul de electroni şi fosforilarea adenozin-difosfatului (ADP) sunt reacţii strâns cuplate, dar în mitocondriile lezate, transportul de electroni se poate produce fără să fie însoţit de fosforilare oxidativă. Energia poate fi eliberată, dar electronii sunt transferaţi în afara lanţului de transport şi această energie nu este captată ca ATP. Ea apare sub formă de căldură.

Localizarea lanţului de transport de electroni

Fosforilarea oxidativă este îndeplinită de către lanţul respirator, ansamblul localizat în membrana internă a mitocondriei. Ciclul acidului citric şi calea de oxidare a acizilor graşi, care furnizează cea mai mare parte din moleculele de NADH şi $FADH_2$ ce iau parte la reacţie, se găsesc în matricea mitocondrială. Oxidarea unei molecule de NADH produce trei molecule de ATP, în timp ce oxidarea unei molecule de $FADH_2$ produce două molecule de ATP.

Lanţul de transport de electroni (lanţul respirator) conţine numeroşi transportori de electroni, cum sunt citocromii. Etapă de etapă, transferul de electroni de la NADH sau $FADH_2$ la O_2 prin aceşti transportori conduce la pomparea protonilor afară din matricea mitocondriilor. Este generată o forţă protonică, ce constă dintr-un gradient de pH şi un potenţial electric transmembranar. ATP este sintetizat când protonii se „scurg" înapoi în matricea mitocondrială, printr-un complex enzimatic. Deci: oxidarea şi fosforilarea sunt cuplate printr-un gradient de protoni peste membrana internă a mitocondriei (figura 45).

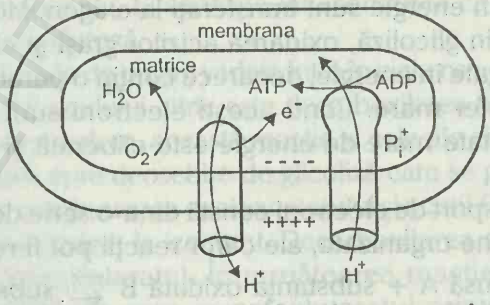


Fig. 45. Cuplarea sintezei de ATP cu fluxul transmembranar al protonilor.

Mitocondria este un organ special cu dimensiuni de aprox. 2 μm lungime şi 0,5 μm diametru. Tehnici pentru izolarea mitocondriilor au fost puse la punct încă din anul 1940. Eugene Kennedy şi Albert Lehninger au descoperit că mitocondria conţine ansamblul lanţului respirator, enzimele ciclului acidului citric şi enzimele pentru oxidarea acizilor graşi. George Palade şi Fritjof Sjöstrand studiind mitocondria prin tehnici de microscopie electronică au arătat că mitocondria are două sisteme membranare: o membrană

externă şi alta internă, mult pliată. Membrana internă este pliată într-o serie de striuri rigide, numite creste (vezi fig. 16 pag. 33). Pe de altă parte, în mitocondrie sunt două compartimente: spaţiul intermembranar, între membranele internă şi externă şi matricea, care este mărginită de membrana internă. Fosforilarea oxidativă are loc în membrana mitocondrială internă, spre deosebire de multe dintre reacţiile ciclului acidului citric şi ale oxidării acizilor graşi, care se produc în matrice. Membrana externă este permeabilă la multe molecule mici şi ioni, deoarece are mulţi pori. În contrast, membrana internă are o mare selectivitate a permeabilităţii:

a) Are sistem de transport numai pentru substanţe specifice:

– ATP, ADP, P_i

– Piruvat, succinat, α-cetoglutarat, malat şi citrat

– Citidin şi guanozin trifosfaţi şi difosfaţi

b) Enzimele lanţului de transport de electroni sunt încrustate în membrana internă în asociaţie cu enzimele fosforilării oxidative. Matricea este delimitată de membrana internă şi conţine:

– Enzimele ciclului acidului citric cu excepţia succinat dehidrogenazei, care este încrustată în membrana internă

– Enzimele β oxidării acizilor graşi

– Diferite alte enzime

Surse de electroni

a) Nicotin amid-adenin dinucleotidul redus (NADH) provenit de la NAD^+ legat de activitatea dehidrogenazelor ca:

– Izocitrat, α-cetoglutarat şi malat dehidrogenazele din ciclul acidului citric

– Piruvat dehidrogenaza

– 1-3 hidroxilacil coenzima A (CoA) dehidrogenaza de la arderea acizilor graşi

– Diferite alte dehidrogenaze legate de NAD^+

b) Flavin-adenin dinucleotidul redus ($FADH_2$) provenit de la FAD, legat de activitatea următoarelor dehidrogenaze:

– Succinat dehidrogenaza din ciclul acidului citric

– Dehidrogenaza legată de FAD din „naveta"-glicerofosfatului

– Acil CoA dehidrogenaza din oxidarea acidului gras

– Diferite alte dehidrogenaze legate de FAD

Organizarea lanţului de transport de electroni

Lanţul respirator constă din 3 complexe enzimatice, legate prin 2 transportori de electroni mobili: coenzima Q şi citocromul C.

Complexul I este punctul de intrare în lanţul de transport de electroni de la NADH. Complexul enzimatic care catalizează această reacţie se numeşte NADH-coenzima Q reductaza, cunoscută de asemenea şi sub numele de NADH-dehidrogenaza, o enzimă mare de aprox. 850 Kd, formată din 25 de lanţuri de polipeptide.

Grupările prostetice sunt: flavin mononucleotidul (FMN) şi centrele Fe-S.

Acceptorul de electroni pentru complexul I este coenzima Q, numită de asemenea şi ubiquinona (datorită omniprezenţei sale) sau simplu „Q"; este un derivat quinonă cu o coadă lungă formată din unităţi de izopren. Numărul de unităţi de izopren depinde de specie (la mamifere sunt de obicei 10 unităţi). Coenzima Q face legătura cu complexul citocrom C reductaza (complexul III). Ea mai transportă spre acest complex (citocrom C reductaza) şi electronii de la $FADH_2$ (complexul II) produşi de exemplu prin oxidarea succinatului în ciclul acidului citric.

Să ne reamintim că $FADH_2$ este format în ciclul acidului citric prin oxidarea succinatului la fumarat de către succinat dehidrogenază, parte a

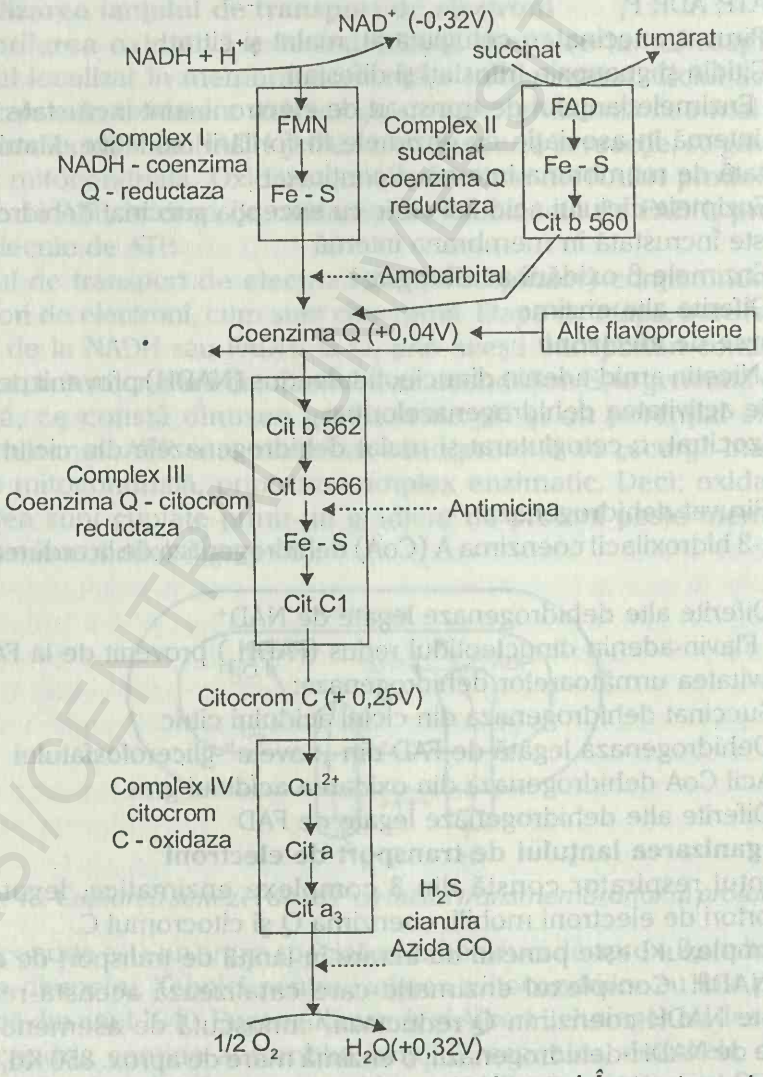


Fig. 46. Lanţul mitocondrial de transport de electroni. În casete sunt grupele oxido-reducătoare din fiecare complex. Direcţia cursului electronilor este indicată prin săgeată. Locul de acţiune al inhibitorilor este indicat prin săgeata punctată.

complexului succinat Q reductaza, o proteină integrată în membrana internă a mitocondriei. Deci $FADH_2$ nou-format, nu trebuie să părăsească complexul, dar electronii săi sunt transferaţi la centrele Fe-S şi apoi la coenzima Q, pentru a intra în lanţul transportor de electroni. De asemenea nucleul $FADH_2$ al glicerol fosfat dehidrogenazei şi acil CoA dehidrogenaza acidului gras transferă potenţialul lor electronic la coenzima Q. Coenzima Q este numai un transportor de electroni în lanţul respirator, care nu este permanent legată sau ataşată covalent la o proteină. Complexul succinat Q reductaza şi alte enzime care transferă electroni de la $FADH_2$ la coenzima Q nu sunt pompe de protoni, spre deosebire de NADH-Q reductaza, deoarece schimbul de energie liberă este atât de mic, încât se formează o cantitate mai mică de ATP prin oxidarea $FADH_2$, decât prin aceea a NADH (figura 46).

Calea transferului de electroni

Electronii de la NADH sunt transferaţi la FAD, apoi la centrul Fe-S şi apoi la coenzima Q. Inhibitorii transferului de electroni de la NADH la coenzima Q includ barbituraţi, unele insecticide (rotenonul), unele antibiotice (antimicina A).

Complexul II este punctul de intrare în lanţul transportului de electroni pentru electronii de la succinat.

Complexul enzimatic care catalizează această reacţie este numit succinat-coenzima Q reductaza şi include succinat dehidrogenaza, fiind aceeaşi enzimă care participă în ciclul acidului citric.

Grupările prostetice sunt: FAD, centrele Fe-S şi hemul (gruparea prostetică a citocromului b 562).

Acceptorul de electroni pentru complexul II este de asemenea coenzima Q. Coenzima Q acceptă electroni de la ambele complexe (complexul I şi complexul II). Ea este redusă la o formă intermediară, un radical liber semiquinona, prin captarea unui singur electron. Reducerea acestui intermediar cu un al doilea electron dă forma redusă a coenzimei Q (ubiquinol) (QH_2). Electronii primiţi de la complexele I şi II sunt cedaţi complexului III. „Complexul III" este acceptorul de electroni cedaţi de coenzima Q. Complexul enzimatic, care catalizează această reacţie, este denumit „citocrom-reductază", coenzima Q-citocrom reductază sau ubiquinol-citocrom C reductază.

Grupările prostetice ale complexului III sunt: hemul (citocromii de tip b şi citocromul c_1) şi centrele Fe-S.

Acceptorul de electroni este citocromul c.

Calea transferului de electroni: electronii de la coenzima Q sunt transferaţi la citocromii de tip b, apoi la centrul Fe-S, apoi la citocromul c_1 şi în sfârşit la citocromul c.

Inhibitorii transferului de electroni de la coenzima Q la citocromul c_1 includ unele antibiotice (antimicina A).

A doua din cele trei pompe de protoni din lanţul respirator este citocrom-reductaza. Un citocrom este o proteină transportoare de electroni care conţine o grupare prostetică, hem.

„Citocromul c", spre deosebire de alte componente ale lanţului respirator, este o proteină solubilă, care se leagă de membrană pentru a îndeplini rolul de transportor de electroni. Rolul cheie al citocromilor în lanţul respirator a fost arătat de David Keilin, în 1925. Ionii de fier din structura citocromului alternează între forma redusă (feroasă)(+2) şi forma oxidată (ferică)(+3) în timpul transportului. Funcţia citocrom reductazei este aceea de a cataliza transferul de electroni de la QH_2 la citocromul c, o proteină solubilă în apă şi de a continua pompa de protoni peste membrana mitocondrială internă.

Citocrom reductaza conţine două tipuri de citocromi, numiţi b şi c_1. De asemenea, reductaza mai conţine o proteină Fe-S şi multe alte lanţuri polipeptidice.

Gruparea prostetică a citocromilor b, c_1 şi c, este Fe-porfirina IX, acelaşi hem ca în mioglobină şi hemoglobină. Hemul din citocromul c şi c_1, spre deosebire de cel al citocromului b, este ataşat covalent la o proteină. Legăturile sunt tioesteri, formaţi prin adiţionarea de grupări sulfhidril din două reziduuri cisteină, la grupul vinil al hemului. Coenzima Q transferă unul din cei 2 electroni cu potenţial energetic mare, la nucleul citocrom-reductazei. Acest electron este apoi transferat succesiv la citocromul c_1 şi citocromul c care îl transportă mai departe din acest complex. Acest electron transferat, converteşte coenzima Q (QH_2) într-o semiquinonă (QH.). Ce se întâmplă cu electronul care rămâne în semiquinonă? Aici intervine citocromul b, cu cele două grupe de hem ale sale. Aceste două grupe de hem identice au afinitate electronică diferită şi proprietăţi spectrale diferite, deoarece mediul polipeptidic înconjurător este diferit. De aceea, unul este citocrom b 566, iar celălalt citocrom 562, deoarece ei absorb maximum de lumină la lungimea de undă de 566 nm şi 562 nm. Coenzima Q transferă electronii la b 566, care apoi reduce citocromul b 562. La rândul său b 562 reduce QH. la QH_2. Reacţia catalizată de citocrom b este:

$$QH + QH \xrightarrow{\text{cit.b}} QH_2 + Q$$

În esenţă, componenta citocrom b a reductazei are o funcţie de reciclare, care permite ca transportorul a 2 electroni (coenzima Q) să interacţioneze cu transportorul unui electron (nucleul Fe-S) (figura 47).

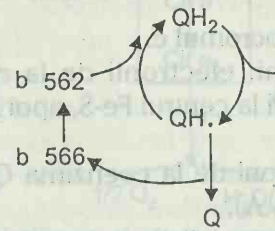


Fig. 47. Calea transferului de electroni în citocrom reductază de la QH_2 la un nucleu Fe-S în citocromul C_1 şi apoi în citocromul C. Cele două grupări hem ale citocromului b din acest complex reduc şi oxidează două molecule de QH în QH_2 şi Q.

Hemul din citocromul c şi c_1 este ataşat covalent la două lanţuri de cisteină.

Complexul IV este acceptorul de electroni de la citocromul c.

Complexul enzimatic care catalizează această reacţie este citocrom c-oxidaza (citocrom oxidaza), ultima din cele trei pompe de protoni din lanţul respirator. Citocrom oxidaza catalizează transferul electronilor de la citocromul c redus la oxigenul molecular ca acceptor final. Se crede că boala Alper se datorează unei deficienţe a citocrom oxidazei.

Grupările prostetice din complexul IV sunt: cuprul (Cu^{2+}) şi hemul (citocrom a şi citocrom a_3).

Acceptorul de electroni pentru complexul IV este oxigenul molecular (O_2).

Calea transferului de electroni. Electronii de la citocromul c sunt transferaţi la Cu^{2+}, apoi la O_2. Produsul reacţiei este H_2O.

Inhibitorii transferului de electroni de la citocromul c la O_2 sunt: monoxidul de carbon, care competiţionează cu O_2 pentru legarea la *situs*-ul de pe citocromoxidază, hidrogenul sulfurat (H_2S), azida (un compus ce conţine N_3) şi cianura (CN).

Reacţia catalizată de citocrom-oxidază este:

$$4 \text{ cit. } c(+2) + 4H^+ + O_2 \rightarrow 4 \text{ cit. } c(+3) + 2H_2O$$

4 electroni sunt combinaţi cu O_2 pentru a-l reduce complet la H_2O şi concomitent să pompeze protonii din matrice spre spaţiul citozolic al membranei interne a mitocondriei (termenul de citozolic este folosit pentru a delimita locul din membrana internă opus matricei, deoarece acesta este mai uşor accesibil multor molecule mici din citozol; membrana externă a mitocondriei având pori, mulţi metaboliţi pot trece prin ea). Reacţia este efectuată de un complex de cel puţin 8 subunităţi dintre care trei sunt numite: subunitatea I, II şi III şi sunt codate de către genomul mitocondrial propriu. Citocrom-oxidaza conţine două grupe de hem A şi doi ioni de Cu. Hemul A diferă de hemul din citocromul c şi c_1 prin aceea că o grupă formil, înlocuieşte o grupă metil şi un lanţ hidrocarbonat înlocuieşte unul din grupele vinil.

Grupele de hem, deşi identice din punct de vedere chimic, au proprietăţi diferite, deoarece sunt localizate în diferite părţi ale citocrom-oxidazei. Unul dintre nucleele de hem se numeşte hem a, iar celălalt hem a_3. La fel cei doi ioni de cupru, numiţi Cupru A (Cu A) şi Cupru B (Cu B) sunt diferiţi, deoarece ei au legături cu proteine diferite. Hemul a este legat de Cu A în subunitatea II, iar hemul a_3 este lângă Cu B în subunitatea I.

Unităţile de oxido-reducere ale citocrom-oxidazei cunoscute ca citocrom a şi a_3 sunt localizate în subunităţile I şi II.

Ferocitocromul c îşi donează electronii la nucleul a-Cu A. Un electron este transferat apoi la hem a_3-Cu B unde O_2 este redus într-o serie de etape la 2 molecule de apă.

Oxigenul molecular este un acceptor de electroni ideal. Afinitatea sa mare pentru electroni furnizează o forţă termodinamică mare pentru

fosforilarea oxidativă; în afară de aceasta, spre deosebire de alţi acceptori de electroni puternici (ex: Fe), oxigenul reacţionează foarte încet, nefiind activat de catalizatori. Cu toate acestea sunt riscuri în reducerea oxigenului. Transferul a 4 electroni duce la producerea sigură a 2 molecule de apă, dar în cazul reducerii parţiale se produc compuşi de mare risc. În special anionul superoxid, un compus foarte nociv care se formează prin transferul unui singur electron la O_2^-.

$$O_2 + e^- \rightleftarrows O_2^- \text{ (anionul superoxid)}$$

Strategia pentru reducerea în siguranţă a O_2 este aceea de a nu permite eliberarea produşilor intermediari parţial reduşi. Acest rol îl îndeplineşte citocrom oxidaza. Oxidarea şi fosforilarea sunt cuplate prin forţa protonilor.

Fluxul de electroni de la NADH la O_2 este un proces exergonic.

$$NADH + 1/2\ O_2 + H^+ \rightleftarrows H_2O + NAD^+ \quad \Delta G^{\circ\prime} = -52{,}6 \text{ Kcal/mol.}$$

($\Delta G^{\circ\prime}$ negativ semnifică o reacţie exergonică în condiţii standard)

Această energie liberă, de oxidare, este folosită la sinteza de ATP.

$$ADP + P_i + H \rightleftarrows ATP + H_2O \quad \Delta G^{\circ\prime} = +7{,}3 \text{ Kcal/mol.}$$

Sinteza de ATP este îndeplinită de un ansamblu molecular în membrana internă a mitocondriei. Acest complex enzimatic se numeşte ATP-aza mitocondrială (H^+ - ATP-aza – deoarece a fost pusă în evidenţă în cataliza reacţiilor hidrolitice şi ATP sintaza (nume ce subliniază rolul actual în mitocondrie); mai este cunoscut sub numele de F_0F_1-ATP-aza.

Energia eliberată de către transferul de electroni catalizat prin *situs*-urile de cuplare (complex I, complex III şi complex IV) este suficientă pentru a duce la formarea unui mol de ATP. Electronii care intră în lanţul respirator de la NADH suportă sinteza a 3 moli de ATP. Electronii care intră în lanţ la $FADH_2$ pot să sintetizeze 2 moli de ATP.

Au fost mai multe ipoteze asupra modului în care oxidarea NADH este cuplată la fosforilarea ADP. Prima ipoteză sugera că transferul de electroni duce la formarea unui intermediar foarte bogat în energie, care serveşte de precursor al ATP. Această ipoteză s-a bazat pe mecanismul de formare a compusului 1,3 bifosfatului în cursul glicolizei, care este un intermediar înalt energetic. Altă alternativă propusă a fost aceea că energia liberă din oxidare este captată într-o proteină activată conformaţional, care apoi conduce la sinteza de ATP. Au fost făcute multe investigaţii, dar aceşti intermediari proteici bogaţi în energie nu au fost găsiţi. O ipoteză complet diferită este ipoteza chemiosmotică, postulată de Peter Mitchell, în 1961. El a susţinut că transportul de electroni şi sinteza de ATP sunt cuplate cu un gradient de protoni prin membrana internă a mitocondriei mai degrabă decât de un intermediar înalt energetic sau de o proteină activată conformaţional. În

acest model, transferul de electroni prin lanţul respirator duce la pomparea protonilor de la matrice la alte sedii ale membranei interne ale mitocondriei. Concentraţia de H^+ devine mai mare în spaţiul citozolic şi este generat un potenţial electric cu acea latură pozitivă. Mitchell a postulat că forţa motrice a protonilor conduce la sinteza de ATP prin complexul ATP-ază. În esenţă, primul eveniment conservator de energie în acest model, este deplasarea protonilor prin membrana internă a mitocondriei (figura 48).

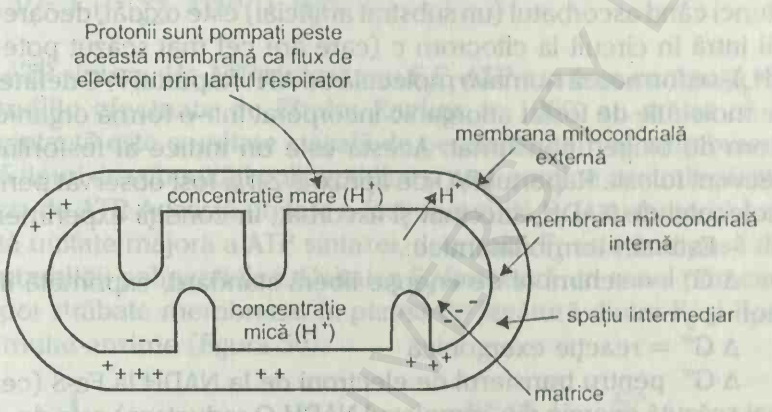


Fig. 48. Pompa mitocondrială de electroni.

Transferul de electroni prin lanţul respirator duce la pomparea protonilor din matrice în spaţiul citozolic al membranei mitocondriale interne. Gradientul de pH şi potenţialul de membrană constituie o forţă protonică folosită la sinteza de ATP. Ipoteza inovatoare a lui Mitchell după care oxidarea şi fosforilarea sunt cuplate de un gradient de protoni este cel mai frecvent acceptată.

Protonii sunt pompaţi la trei centre ca flux de electroni prin lanţul respirator de la NADH la O_2 (figura 49).

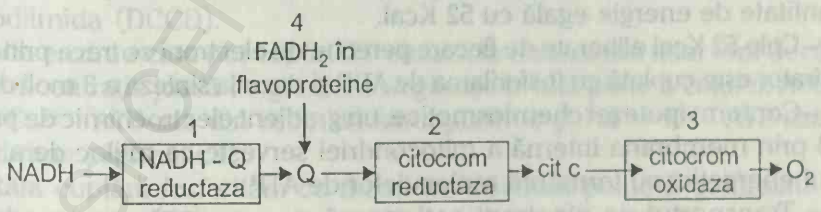


Fig. 49. Secvenţa transportorilor de electroni în lanţul respirator. Protonii sunt pompaţi prin trei complexe enzimatice (în casete).

Protonii sunt pompaţi prin trei complexe enzimatice (în casete). Centrul 1 de pompare a electronilor este complexul NADH-Q reductaza; centrul 2 este citocrom reductaza şi centrul 3 citocrom oxidaza. Gradientul de protoni generat de fiecare centru, de fluxul unei perechi de electroni, poate fi folosit

la sinteza unei molecule de ATP. Aceste centre au fost identificate prin mai multe căi:

– Compararea producţiei de ATP obţinută prin oxidarea mai multor substanţe. Oxidarea NADH-ului produce 3 moli de ATP, în timp ce oxidarea succinatului produce 2 molecule de ATP. Electronii de la $FADH_2$ intră în lanţul de transport de electroni prin QH_2, trecând de primul centru (NADH-Q reductaza), deoarece $FADH_2$ este un donor mai puţin energetic decât NADH. Atunci când ascorbatul (un substrat artificial) este oxidat, deoarece electronii săi intră în circuit la citocrom c (care are cel mai scăzut potenţial faţă de QH_2), se formează numai o moleculă de ATP. Raportul P/C defineşte numărul de molecule de fosfat anorganic încorporat într-o formă organică pentru un atom de oxigen consumat. Acesta este un indice al fosforilării oxidative frecvent folosit. Raportul P/O de aprox. 3/2/1 a fost observat pentru oxidarea moleculei de NADH, succinat şi ascorbat, în condiţii experimentale.

– Estimări termodinamice:

ΔG° = schimbul de energie liberă standard, exprimată în kilocalorii/mol.

ΔG° = reacţie exergonică

ΔG° pentru transferul de electroni de la NADH la Fe-S (centrul cu cea mai scăzută energie din complexul NADH-Q reductaza) este de -12 Kcal/mol, de la citocromul b la c_1 în citocrom reductaza este -10 Kcal/mol şi de la citocrom a la O_2 în citocrom oxidaza este de -24 Kcal/mol. Fiecare din aceste reacţii de oxido-reducere este suficientă din punct de vedere exergonic să genereze o forţă protonică suficientă pentru a duce la sinteză de ATP în condiţii standard (ΔG° = -7,3 Kcal/mol).

În concluzie:

– Potenţialele de oxido-reducere a transportorilor de electroni în lanţul respirator devin mai pozitive, începând cu oxidarea NADH până la reducerea oxigenului molecular.

– Pentru fiecare pereche de electroni care trece prin lanţ se eliberează o cantitate de energie egală cu 52 Kcal.

– Cele 52 Kcal eliberate de fiecare pereche de electroni ce trece prin lanţul respirator este cuplată cu fosforilarea de ADP şi duce la sinteza a 3 moli de ATP.

– Conform ipotezei chemiosmotice, un gradient electrochimic de protoni (H^+) prin membrana internă a mitocondriei serveşte ca mijloc de a cupla fluxul energetic, cu formarea moleculelor de ATP.

– Transportul de electroni acţionează ca o pompă care produce o direcţionare a pompării de H^+ prin membrană.

– Deoarece H^+ este o particulă încărcată, fluxul energiei libere prin membrana internă se datorează combinaţiei dintre un gradient de concentraţie şi un gradient de sarcină.

– În lanţul de transport de electroni, H^+ este în formă electronică şi conform ipotezei de cuplare chemiosmotică electronii se mişcă în josul lanţului, deci H^+ este expulzat, circulând de la matrice spre spaţiul intermembranar.

– Protonii din spaţiul intermembranar trec înapoi prin membrana internă şi revin în matrice la un centru sau „por" special, unde se află ATP sintaza. Consumul de energie la trecerea protonilor prin gradientul de concentraţie spre matrice permite fosforilarea ADP la ATP de către ATP sintaza. Fluxul de protoni prin ATP sintaza duce la formarea unei legături ATP puternice. Reacţia catalizată de enzimă este:

$$ADP^{3-} + P_i^{2-} + H^+ \rightleftarrows ATP^{4-} + H_2O$$

Enzima ATP sintaza, H^+-ATP sintaza sau F_0F_1-ATP-aza este compusă din 2 unităţi. Studiile efectuate de Efraim Racker, în 1960, au arătat că în mitocondria intactă este o unitate ataşată de peretele intern al membranei, formată din 5 tipuri de subunităţi polipeptidice şi care conţine centrul catalitic pentru sinteza de ATP. Această unitate a fost denumită F_1 (sau factorul 1 de cuplare). Altă unitate majoră a ATP sintazei, denumită F_0 este compusă din 4 tipuri de subunităţi polipeptidice. Unitatea F_0 formează un canal prin care ionii de H^+ pot străbate membrana. În partea de legătură dintre F_0 şi F_1 se mai găsesc multe enzime (figura 50).

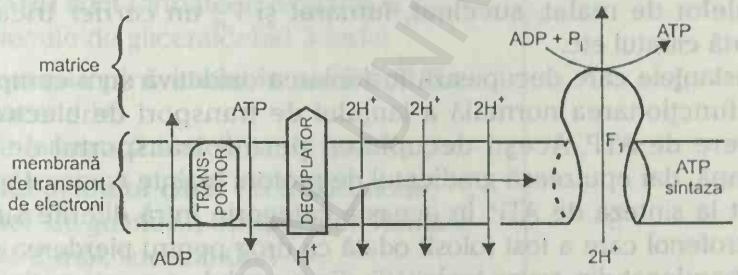


Fig. 50. Diagrama cuplării transportului de electroni cu fosforilarea oxidativă.

Inhibitorii ATP sintetazei includ oligomicina (antibiotic) şi diciclohexil carbodiimida (DCCD).

Alte enzime care pot cupla ATP sintaza la transportul altor ioni decât H^+ la o concentraţie joasă de gradient se găsesc în altă parte a celulei. Acestea sunt: Ca^{2+} - ATP-aza din reticulul sarcoplasmic şi Na^+ - K^+ - ATP-aza din membrana plasmatică.

Rata cuplării fosforilării cu fluxul de electroni poate fi controlată prin concentraţia de ADP, deoarece oxidarea şi fosforilarea sunt strâns cuplate. Energia eliberată prin reacţiile de oxidare este folosită la fosforilarea ADP pentru a produce ATP. Acesta înmagazinează energia folosită pentru nevoile organismului.

Au fost definite 5 situaţii ale controlului în care rata respiraţiei este limitată de diferiţi factori: disponibilitatea de ADP şi substrat (surse de electroni); disponibilitatea de substrat; capacitatea lanţului de electroni în cazul în care ADP, oxigenul şi substratul sunt saturate; disponibilitatea de ADP şi disponibilitatea de oxigen.

Transportul de ADP/ATP

ADP trebuie să fie transportat în matricea mitocondrială pentru a fi folosit la sinteza de ATP, iar moleculele de ATP produse trebuie să părăsească mitocondria pentru a putea fi folosite de celulă. Nici molecula de ADP, nici cea de ATP nu difuzează liber prin membrana internă a mitocondriei. Intrarea ADP-ului în mitocondrie este cuplată cu ieşirea ATP-ului.

$$ADP_c^{3-} + ATP_m^{4-} \rightarrow ADP_m^{3-} + ATP_c^{4-}$$

(în care „c" semnifică spaţiul citozolic, iar „m" = mitocondria)

Enzima care catalizează reacţia se numeşte: ATP-ADP translocaza, un dimer, cu subunităţile de câte 30 Kd fiecare. Translocaza este foarte abundentă, constituind 14% din proteina membranei mitocondriale. ATP-ADP-translocaza este numai unul dintre multiplele sisteme de transport aflate în mitocondrie. Membrana internă conţine o varietate de transportori proteici pentru ioni şi metaboliţi. Aceste proteine transmembranare sunt cunoscute sub numele de cărăuş (*carrier*); de ex: di-carboxilatul mediază transportul moleculelor de malat, succinat, fumarat şi P_i, un *carrier* tricarboxilat transportă citratul etc.

Substanţele care decuplează fosforilarea oxidativă sunt compuşi care permit funcţionarea normală a lanţului de transport de electroni, fără producere de ATP. Aceşti decuplatori permit transportul de H^+ prin membrană, dar epuizează gradientul de protoni înainte ca acesta să poată fi folosit la sinteza de ATP. În această categorie intră diferite substanţe: 2,4-dinitrofenol care a fost folosit odată ca drog pentru pierderea greutăţii, astăzi abandonat din cauza toxicităţii; dicumarolul care este anticoagulant; clorcarbonilcianid fenilhidrazona (CCCP), un component care transportă protoni prin membrană; bilirubina, un metabolit natural al degradării hemului, dar nu este prezent în mod normal în mitocondrie în concentraţie destul de mare pentru a afecta funcţia normală.

Bolile provocate de dereglări ale funcţiei mitocondriale sunt cunoscute sub numele de encefalomiopatii mitocondriale. Acestea sunt un grup clinic heterogen, dar care au în comun prezenţa unor anomalii morfologice ale mitocondriilor musculare. Aceste dereglări pot fi împărţite în 5 grupe: 1. transport de substrat de la citozol la mitocondrie; 2. utilizarea substratului; 3. enzimele ciclului acidului citric; 4. fosforilarea cuplată la transportul de electroni; 5. enzimele lanţului de transport de electroni.

Bilanţul complet al arderii unei molecule de glucoză este de 36 de molecule de ATP. Acum putem calcula câte molecule de ATP se formează când glucoza este complet oxidată.

a) Dacă este folosită calea glicerol fosfatului, reacţia totală este:

$$Glucoza + 36\,ADP + 36\,P_i + 36\,H^+ + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 36\,ATP + 42\,H_2O$$

Raportul P/O este 3, deoarece s-au format 36 de moli ATP şi s-au consumat 12 atomi de oxigen.

b) Dacă este folosită calea malat-aspartat în lanţul respirator sunt sintetizaţi 38 de moli ATP pe molecula de glucoză oxidată. Cea mai mare parte din moleculele de ATP, 32 din 36 sau 34 din 38 sunt sintetizate prin fosforilarea oxidativă. Energia liberă stocată în 36 de mol de ATP este de 263 Kcal, deoarece G° pentru hidroliza unui mol de ATP este de -7,3 Kcal. Pe de altă parte, eficienţa termodinamică a formării de ATP din glucoză este 263/686, sau 38% în condiţii standard.

Tabelul 11

ATP sintetizat prin completa oxidare a glucozei

Secvenţa reacţiilor	ATP per g/glucoza
Glicoliza: glucoza → piruvat (în citozol)	
Fosforilarea glucozei	-1
Fosforilarea fructozo 6-fosfat	-1
Defosforilarea a 2 mol de 1,3-BPG^{+2}	
Defosforilarea a 2 mol de fosfoenolpiruvat	+2
2 NADH sunt formate în oxidarea a 2 molecule de gliceraldehid 3-fosfat	
Conversia piruvatului în acetil CoA (în mitocondrie)	
Sunt formate 2 molecule de NADH	
Ciclul acidului citric (în mitocondrie)	
2 mol. de guanozin trifosfat sunt formate de la 2 mol. succinil CoA	+2
6 mol. NADH sunt formate în oxidarea a câte 2 mol. de izocitrat, αcetoglutarat şi malat	
2 $FADH_2$ sunt formate în oxidarea a 2 mol. de succinat	+4
Fosforilarea oxidativă (în mitocondrie)	+4
2 mol. NADH format în glicoliză (fiecare produce 2 mol. ATP asigurând transportul NADH prin „naveta" glicerol fosfatului)	
2 mol. NADH format în decarboxilarea oxidativă a piruvatului (fiecare produce 3 mol. ATP)	+6
2 $FADH_2$ format în ciclul acidului citric; (fiecare produce 2 mol. ATP)	+4
6 NADH format în ciclul acidului citric	+18
Total	+36

Conceptul cel mai important al fosforilării oxidative este acela că transferul mitocondrial de electroni şi sinteza de ATP sunt legate printr-un gradient de protoni. De fapt gradientul de protoni alimentează cu energie o varietate de procese, care solicită energia, cum este transportul activ de Ca^{2+} prin mitocondrie, transferul de electroni de la NADH sau NADPH. Gradientul de protoni poate fi folosit de asemenea pentru generarea de căldură, cu alte cuvinte este o sursă interconvertibilă de energie liberă.

Metabolismul superoxidului

Oxigenul este potenţial o substanţă toxică. Toxicitatea poate proveni din reducerea parţială a oxigenului molecular (O_2) la radicalul liber, anionul superoxid (O_2^-), o moleculă foarte reactivă şi foarte instabilă, care poate reacţiona cu proteinele şi membranele celulare şi le poate leza. S-a sugerat că superoxidul care produce leziuni poate fi implicat în procesul de îmbătrânire.

1. Formarea superoxidului. Superoxidul poate fi format în mitocondrie, prin reacţia O_2 cu $FADH_2$ redus şi coenzima Q redusă. În alte organe este format prin reacţia O_2 cu enzimele oxidante.

2. Detoxificarea de superoxid. Superoxid dismutaza este o metaloenzimă care catalizează rapid reacţia:

$$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) care se formează prin scindarea superoxidului este de asemenea un compus foarte reactiv şi foarte toxic. El este îndepărtat prin acţiunea peroxidazelor care catalizează reacţia:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

– cea mai răspândită peroxidază din corp este un hem ce conţine enzima catalază;

– în hematii, glutation peroxidaza, o enzimă care conţine seleniu, catalizează această reacţie cu oxidarea concomitentă a glutationului redus;

– un rol important în detoxificarea organismului de superoxid şi alţi radicali liberi, potenţial nocivi, îl au vitaminele C şi E.

Arderea respiratorie este un fenomen imunologic care se produce în timpul fagocitozei. Celulele fagocitare ale sistemului imun produc superoxidul cu scopul de a ucide bacteriile şi virusurile. În timpul arderilor respiratorii se produc următoarele evenimente: consumul de oxigen creşte rapid; mare parte din oxigenul consumat este convertit în superoxid, care distruge materialul fagocitat; o parte din superoxid este convertit în peroxid de hidrogen, care de asemenea, distruge materialul fagocitat.

Defecte genetice. Boala granulomatoza cronică este produsă de un defect genetic care reduce capacitatea celulelor fagocitare de a produce superoxid şi deci peroxidul de hidrogen. Pacienţii cu acest defect genetic au o susceptibilitate crescută la infecţii.

4.2.4. Căile alternative ale metabolismului glucidelor

I. Calea pentozo-fosfatului (şuntul hexozomonofosfatului)

Ciclul acidului citric şi fosforilarea oxidativă au ca scop în primul rând generarea de ATP ca sursă de energie pentru nevoile organismului, prin arderea metabolică a glucozei.

Glucoza mai poate fi metabolizată prin calea alternativă (şuntul hexozomonofosfatului), cu generarea unui tip diferit de energie metabolică, cu putere mai redusă. Unii electroni cu potenţial mare din arderile moleculare trebuie să fie conservaţi pentru biosinteză, mai degrabă decât să fie transferaţi la O_2 pentru generarea de ATP. Prin calea pentozo-fosfatului este generat în celule NADPH substanţă cu potenţial redus.

Gruparea fosforil de la C_2 al unei unităţi riboză a moleculei de NADPH îl deosebeşte fundamental de NADH în multe reacţii biochimice. NADH este oxidat în lanţul respirator pentru a genera ATP, în timp ce NADPH serveşte ca donor de electroni (donor de ioni OH^-) în biosintezele reductive.

Şuntul pentozelor pune de asemenea la îndemâna organismului precursori pentru sinteza acizilor nucleici sau acidului uronic, furnizează metaboliţi care sunt folosiţi la sinteza amino-zaharurilor şi a lactozei. Glucidele, altele decât glucoza (ex: fructoza, galactoza) sau etanolul, pot fi folosite ca surse de energie.

Funcţiile căii pentozo-fosfatului (şuntului hexozomonofosfatului):

– furnizează o sursă de NADPH pentru biosintezele reductive;

– furnizează o sursă de ribozo-5-fosfat pentru biosinteza acidului nucleic;

– furnizează o cale pentru folosirea pentozelor şi pentru conversia lor la fructozo-6-fosfat (F_6P) şi gliceraldehid-3-fosfat. De asemenea catalizează interconversia glucidelor de 3, 4, 5, 6 şi 7 atomi de C prin reacţii neoxidative.

Localizare: calea este mai activă în ficat, glandele mamare, ţesutul adipos şi cortexul suprarenal, iar în celulă enzimele acestei căi sunt localizate în citoplasmă.

Scop: calea pentozo-fosfatului, sau cum mai este numit uneori „calea oxidativă a fosfogluconatului", generează NADPH şi sintetizează zaharuri cu 5 atomi de C.

Prima enzimă din ciclul acestei căi este glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza (G_6PDH), enzimă descoperită de Otto Warburg, în 1931 (calea completă a fost elucidată de Fritz Lipman, Franck Dickens, Bernard Horecker şi Efraim Racker).

Calea pentozelor începe cu dehidrogenarea glucozo-6-fosfatului la C_1 prin reacţia catalizată de G_6PDH. Produsul este 6-fosfoglucono- lactona, un ester intramolecular între gruparea carboxil C_1 şi grupul hidroxil C_5. În etapa următoare, 6-fosfoglucono- δlactona este hidrolizată cu ajutorul enzimei lactonaza pentru a forma 6-fosfogluconat. $NADP^+$ este redus la NADPH. Glucidul cu 6 atomi de carbon este apoi decarboxilat oxidativ pentru a produce ribuloza-5-fosfat. Enzima care catalizează reacţia este 6-fosfogluconat-

dehidrogenaza. În această reacţie $NADP^+$ este redus la NADPH, putând deveni din nou acceptor de electroni. În conversia glucozo-6-fosfatului în ribulozo-5-fosfat sunt generate 2 molecule de NADPH. În ultima etapă ribulozo-5-fosfatul este izomerizat la riboză-5-fosfat şi xiluloză-5-fosfat, trecând printr-un intermediar enediol.

Enzimele care catalizează aceste reacţii sunt: fosfopentozo-izomeraza pentru formarea ribozo-5-fosfatului; fosfopentozo-epimeraza pentru formarea xilozo-5-fosfatului. Această reacţie este asemănătoare cu cea a şi cea prin care dehidroxiaceton-fosfatul este transformat în gliceraldehid-3-fosfat în procesul de glicoliză. Cele 3 cetoze izomerizate trec printr-un intermediar enediol.

În reacţiile anterioare s-au obţinut 2 moli. de NADPH şi o moleculă de riboza-5-fosfat pentru fiecare moleculă de glucozo-6-fosfat oxidată. Cu toate acestea multe celule necesită NADPH pentru biosintezele reductive mult mai multe decât riboza-5-fosfat pentru încorporarea în acizi nucleici şi nucleotide. În acest caz, ribozo-5-fosfatul este convertit în gliceraldehida-3-fosfat şi fructoza-6-fosfat prin transcetolaze şi transaldolaze. Aceste enzime creează o legătură reversibilă între calea pentozo-fosfatului şi glicoliză, prin catalizarea următoarelor reacţii:

$$C_5 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{transcetolaza}} C_3 + C_7$$

$$C_7 + C_3 \xrightleftharpoons{\text{transaldolaza}} C_4 + C_6$$

$$C_5 + C_4 \xrightleftharpoons{\text{transcetolaza}} C_3 + C_6$$

Rezultatul net al acestor reacţii este formarea a 2 hexoze şi o trioză din 3 pentoze. Esenţa acestor reacţii este aceea că o transcetolază transferă o unitate de 2 atomi de C, în timp ce transaldolaza transferă o unitate de trei atomi de carbon.

Glucidul care donează unitatea de 2 sau 3 atomi de carbon este întotdeauna cetoza, iar acceptorul este întotdeauna aldoza. Prima dintre cele trei reacţii care leagă calea pentozo-fosfatului de glicoliză este formarea gliceraldehid-3-fosfatului şi a sedoheptulozo-7-fosfatului din 2 pentoze. Donorul este xiluloza-5-fosfat, un epimer al ribozo-5-fosfatului. Produşii de reacţie, gliceraldehid-3-fosfatul şi sedoheptuloza-7-fosfatul, reacţionează pentru a forma fructoză-6-fosfat şi eritroză-4-fosfat. Această reacţie duce la formarea unui glucid cu 4 atomi de carbon şi un glucid cu 6 atomi de C şi este catalizată de transaldolază.

$$\begin{matrix}\text{sedoheptuloza-}\\ \text{7-fosfat}\end{matrix} + \begin{matrix}\text{gliceraldehida-}\\ \text{3-fosfat}\end{matrix} \xrightleftharpoons{\text{transaldolaza}} \begin{matrix}\text{eritroza}\\ \text{4-fosfat}\end{matrix} + \begin{matrix}\text{fructoza}\\ \text{6-fosfat}\end{matrix}$$

În cea de a treia reacţie catalizată de transcetolază se sintetizează fructoză-6-fosfat şi gliceraldehid-3-fosfat din eritroză-4-fosfat şi xiluloză-5-fosfat.

xiluloză-5-fosfat +	eritroză 4-fosfat	transcetolaza ⇌	gliceraldehid 3-fosfat	fructoza 6-fosfat

Suma acestor reacţii este:

2 xiluloză 5-fosfat + riboză 5-fosfat ⇄ 2 fructoză 6-fosfat + gliceraldehida 3-fosfat

Xiluloză 5-fosfatul poate fi format din riboză 5-fosfat prin acţiunea succesivă a fosfopentozo-izomerazei şi fosfopentozo-epimerazei. Reacţia porneşte de la riboza 5-fosfat şi este:

3 ribozo 5-fosfat ⇄ 2 fructozo 6-fosfat + gliceraldehida 3-fosfat

Astfel, excesul de riboză 5-fosfat format pe calea pentozo-fosfatului, poate fi convertit complet în metabolismul glicolitic.

Fluxul căii pentozo-fosfatului este controlat de concentraţia de $NADP^+$. Prima reacţie în calea pentozo-fosfatului, dehidrogenarea glucozo 6-fosfatului, este ireversibilă şi este esenţială. De fapt, această reacţie este „limitatoare" în condiţii fiziologice şi serveşte drept centru de control. Cel mai important factor reglator este concentraţia de $NADP^+$, acceptorul de electroni în oxidarea glucozo 6-fosfatului cu formarea 6-fosfogluconolactonei. De asemenea, NADPH competiţionează cu $NADP^+$ în legarea cu enzima. Raportul $NADP^+$/NADPH în citozolul celulelor din ficatul de şoarece este aprox. 0,014, mult mai scăzut decât raportul NAD^+/NADH care este aprox. 700, în aceleaşi condiţii. Efectul concentraţiei de $NADP^+$ asupra ritmului ramurii oxidative asigură faptul că generarea de NADPH este strâns legată de utilizarea lui în biosintezele reductive. Ramura neoxidativă a căii pentozo-fosfatului este controlată în special de concentraţia de substrat.

Fluxul glucoză 6-fosfatului depinde de nevoia de NADPH, riboza 5-fosfat şi ATP. Astfel:

a. Dacă se solicită mai multă riboză 5-fosfat decât NADPH, este convertită mai multă glucoză 6-fosfat în fructozo 6-fosfat şi gliceraldehida 3-fosfat prin intermediul căii glicolitice. Transaldolaza şi transcetolaza convertesc două molecule de fructoză 6-fosfat şi o moleculă de gliceraldehidă 3-fosfat în trei molecule de riboză 5-fosfat. Calculul stoechiometric este:

Glucoza 6-fosfat + $2NADP^+$ + H_2O — riboza 5-fosfat + 2NADPH + $2H^+$ + CO_2

Reacţiile din calea pentozo-fosfatului

Partea oxidativă / reacţia	**Enzima**
Glucoza 6-fosfat + NADP+ → 6-fosfoglucono- δ lactona + NADPH+ H^+	+Glucoza 6-fosfat dehidrogenaza
6-fosfoglucono- δ lactona + H_2O → 6-fosfogluconat + H^+	lactonaza
6-fosfogluconat + NADP+ → ribulozo 5-fosfat + CO_2 + + NADPH	6-fosfogluconat dehidrogenaza
Partea neoxidativă	
ribuloza 5-fosfat ⇄ riboză 5-fosfat	fosfopentozo-izomeraza
ribuloza 5-fosfat ⇄ xiluloză 5-fosfat	fosfopentozo-izomeraza
xiluloza 5-fosfat + ribozo 5-fosfat ⇄ sedoheptuloza 7-fosfat + gliceraldehid 3-fosfat	transcetolaza
sedoheptuloza 7-fosfat + gliceraldehid 3-fosfat ⇄ fructoză 6-fosfat + eritroză 4-fosfat	transaldolaza
xiluloza 6-fosfat + eritroza 4-fosfat ⇄ fructoza 6-fosfat + gliceraldehid 3-fosfat	transcetolaza

b. Dacă nevoile de NADPH şi riboză 5-fosfat sunt echilibrate, reacţia predominantă este formarea a 2 molecule de NADPH şi una de riboză 5-fosfat din glucoza 6-fosfat, prin ramura oxidativă a căii pentozo-fosfatului. Calculul stoechiometric al reacţiei este:

Glucozo 6-fosfat + 2$NADP^+$ + H_2O → riboza 5-fosfat + 2NADPH + 2H^+ + CO_2

c. Dacă este solicitat mai mult NADPH decât ribozo 5-fosfat, atunci glucozo 6-fosfatul este complet oxidat la CO_2. În această situaţie sunt active trei grupe de reacţii. Întâi, două molecule de NADPH şi una de riboză 5-fosfat se formează în partea oxidativă a căii pentozo-fosfatului. Apoi, ribozo 5-fosfatul este convertit în fructozo 6-fosfat şi gliceraldehid 3-fosfat de către transcetolază şi transaldolază. În sfârşit, este resintetizată glucoza 6-fosfat din fructoza 6-fosfat şi gliceraldehid 3-fosfat prin calea gluconeogenetică.

Suma acestor reacţii este:

$$\text{Glucoza 6-fosfat} + 12NADP^+ + 7H_2O \rightarrow 6CO_2 + 12NADPH + 12H^+ + P_i$$

Deci: o moleculă de glucozo 6-fosfat poate fi complet oxidată la CO_2 cu generarea concomitentă de NADPH. Scopul acestor reacţii este ca ribozo 5-fosfatul, produs prin calea pentozelor, să fie reciclat în glucozo 6-fosfat, prin transcetolaze, transaldolaze şi unele enzime din calea gluconeogenetică.

d. Alt aspect este atunci când este solicitat mai mult NADPH decât riboza 5-fosfat: glucoza 6-fosfatul este convertită în piruvat, prin ramura oxidativă a căii pentozo-fosfatului. Fructozo 6-fosfat şi gliceraldehid 3-fosfatul provenit din riboza 5-fosfat intră în calea glicolitică mai degrabă decât să revină la glucoza 6-fosfat. În acest fel ATP şi NADPH sunt generaţi concomitent şi cinci din cei şase atomi de carbon ai glucozo 6-fosfatului intră în piruvat.

$$3 \text{ glucozo 6-fosfat} + 6NADP^+ + 5NAD^+ + 5P_i + 8ADP \rightarrow 5 \text{ piruvat} + 3CO_2 + 6NADPH + 5NADH + 8ADP + 2H_2O + 8H^+$$

Piruvatul format în aceste reacţii poate fi oxidat pentru a genera mai mult ATP, sau poate fi folosit ca material de sinteză. Experienţe făcute cu izotopi radioactivi (^{14}C) au arătat că în muşchiul scheletic activitatea căii pentozo-fosfatului este foarte scăzută, în timp ce în ţesutul adipos este foarte activă. Aceste constatări confirmă faptul că rolul major al căii pentozo-fosfatului este generarea de NADPH pentru biosintezele reductive. O mare parte din NADPH este consumat în ţesutul adipos în sinteza reductivă a acizilor graşi de la acetil CoA.

Dereglările metabolice datorate deficienţei unor enzime din calea pentozo-fosfatului

a. O deficienţă de glucozo 6-fosfat dehidrogenază (G_6PD) produce o dereglare la nivelul hematiilor. Integritatea hematiilor depinde de NADPH format în calea metabolică a pentozelor, care este solicitat pentru menţinerea glutationului în stare redusă. Glutationul redus este necesar pentru integritatea globulelor roşii. Când fluxul este deficitar se produce o dereglare: anemie hemolitică.

Deficienţa poate fi genetică sau este datorată unor droguri sau medicamente care acţionează ca substanţe oxidante (ex: aspirina, sulfamida, medicamentele antimalarice); pot produce anemia hemolitică prin oxidarea glutationului redus. Problema inducerii anemiei hemolitice de către unele medicamente cu acţiune oxidantă a fost elucidată în anul 1956. Defectul primar este o deficienţă în glucozo 6-fosfat dehidrogenază în globulele roşii. Calea pentozo-fosfatului este singura sursă de NADPH în globulele roşii, deoarece ele sunt lipsite de mitocondrii, aşa încât producerea de NADPH este mult scăzută datorită acestei deficienţe. Rolul NADPH este de a reduce forma disulfit

a glutationului la forma sulfhidril, reacţie catalizată la glutation reductaza. Forma redusă a glutationului joacă rol în detoxificare, deoarece reacţionează cu peroxizii. Glutationul redus este esenţial pentru menţinerea structurii normale a globulelor roşii şi menţinerea hemoglobinei în forma redusă. Globulele cu nivel mai redus de glutation sunt mai susceptibile la liză.

b. Sindromul *Wernicke-Korsakoff* este produs de o deficienţă cronică de tiamină. Bolnavii cu acest sindrom au o deficienţă de transcetolază care antrenează o afinitate redusă pentru TPP. Alte enzime dependente de TPP par să fie normale. În condiţiile unui deficit de tiamină, activitatea transcetolazei este scăzută, fapt care conduce la manifestările clinice ale sindromului: slăbiciune sau paralizie, deteriorarea funcţiei mentale etc.

Concluzie

Calea pentozo-fosfatului generează NAPDH şi ribozo 5-fosfatul în citozol. NADPH este folosit în biosintezele reductive, în timp ce riboza 5-fosfatul este folosit în sinteza de RNA, DNA şi enzimele nucleotide.

Calea pentozo-fosfatului începe cu dehidrogenarea glucozo 6-fosfatului pentru a forma lactona, care este apoi hidrolizată. Rezultă 6-fosfogluconatul, care printr-o decarboxilare oxidativă dă ribulozo 5-fosfat. În ambele reacţii de oxidare $NADP^+$ este acceptor de electroni. Ultima etapă este izomerizarea ribulozo 5-fosfatului (o cetoză) în ribozo 5-fosfat (o aldoză).

Calea pentozo-fosfatului se activează diferit. Când celula are nevoie de mai mult NADPH decât de ribozo 5-fosfat, ribozo 5-fosfatul este convertit în gliceraldehid 3-fosfat şi fructoză 6-fosfat de către transcetolază şi transaldolază. Aceste două enzime creează o legătură ireversibilă între calea pentozo-fosfatului şi glicoliză. Xiluloza 5-fosfatul, sedoheptuloza 7-fosfat şi eritroza 4-fosfat sunt intermediari în aceste conversii.

În calea pentozo-fosfatului sunt generate 12 molecule de NADPH pentru fiecare moleculă de glucoză 6-fosfat, care este complet oxidată la CO_2.

Când este nevoie să fie sintetizată o cantitate de riboză 5-fosfat mai mare decât NADPH, este activată numai ramura neoxidativă a căii metabolice. În aceste condiţii fructoza 6-fosfat şi gliceraldehid 3-fosfatul, formaţi în calea glicolitică, sunt convertiţi în ribozo 5-fosfat fără să se formeze NADPH.

Alternativ, ribozo 5-fosfatul format prin ramura oxidativă, poate fi convertit în piruvat prin calea fructozo 6-fosfat şi gliceraldehid 3-fosfat. În acest fel este generat ATP şi NADH şi cinci dintre atomii glucozo 6-fosfatului intră în piruvat.

Interrelaţia dintre calea glicolitică şi calea pentozo-fosfatului stabileşte concentraţia de NADPH, ATP şi a materialului de sinteză, ca riboza 5-fosfat şi piruvatul, care sunt ajustaţi continuu, după nevoile celulei.

II. Calea acidului uronic (ciclul acidului glucuronic)

Funcţii:

1. Calea acidului uronic este o sursă de gluconat activat pentru:

a) Formarea glucuronozidelor pentru detoxificarea organismului (un glucuronozid este acidul glucuronic conectat la alţi compuşi printr-o legătură

glicozidică). Multe substanţe, ca şi multe medicamente, sunt eliminate din corp prin formarea de derivaţi glucuronozizi. Complexarea unei game mari de produşi le permite să fie excretaţi în bilă şi urină sub formă de compuşi solubili în apă (compuşii conjugaţi solubili în apă sunt: hormoni steroizi, bilirubina, acidul salicilic, morfina etc.).

Reacţia generală este:

Uridindifosfat glucuronozid (UDP - glucuronozid) + acceptor → glucuronozid + UDP

b) Biosinteza unor polizaharide. UDP glucuronatul este donor pentru nucleul glucuronil în unele polizaharide ca heparina.

c) Biosinteza condroitin sulfatului, un glicozaminoglican.

2. La multe animale este calea de formare a acidului ascorbic (vit. C), cu excepţia omului şi a altor primate (cobai etc.).

3. Calea acidului uronic este de asemenea necesară pentru formarea pentozelor şi metabolismul derivaţilor glucidici nefosforilaţi.

4. Calea este o sursă de UDP-glucoză, necesară pentru sinteza glicogenului (figura 51).

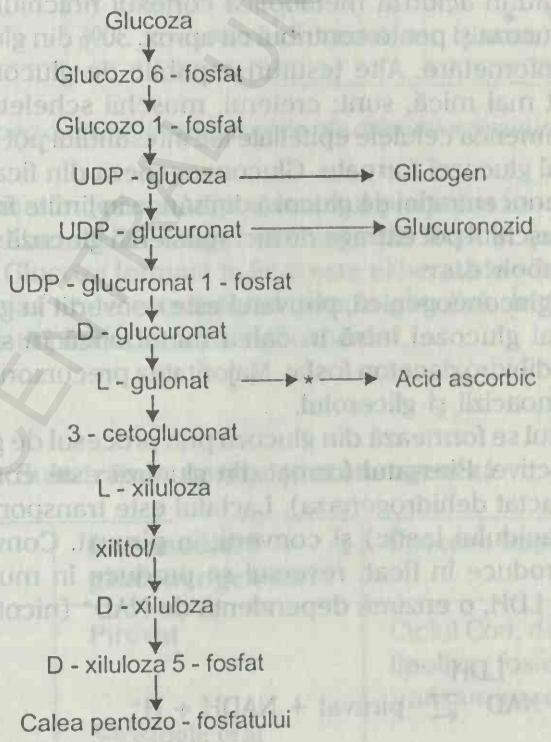


Fig. 51. Calea acidului uronic. Asterixul indică faptul că formarea acidului ascorbic nu este posibilă la om.

4.2.5. Gluconeogeneza

Procesul biochimic prin care glucoza este sintetizată din precursori neglucidici poartă numele de gluconeogeneză. Această cale metabolică este foarte importantă deoarece creierul este dependent de glucoză, care este combustibilul esenţial; hematiile solicită de asemenea glucoză. Creierul are nevoie zilnic de aprox. 120 g. glucoză, din totalul de 190 g. solicitat de întreg organismul. Rezervele de glucoză din dieta zilnică sunt suficiente pentru aproximativ 24 de ore. După o perioadă de înfometare mai lungă, glucoza este formată din alte surse decât glucidele, pentru supravieţuirea organismului.

În timpul exerciţiului fizic îndelungat, când nivelul mare de catecolamine a mobilizat glucidele şi rezervele de lipide, calea neoglucogenezei permite folosirea lactatului rezultat prin glicoliză şi al glicerolului din metabolismul lipidelor. De asemenea, în timpul acidozei metabolice, gluconeogeneza din rinichi permite excreţia unui număr crescut de protoni.

Cea mai mare parte a gluconeogenezei are loc în ficat. În condiţii normale, ficatul este responsabil de 85-95% din glucoza sintetizată. În timpul înfometării sau în acidoză metabolică cortexul rinichiului este capabil să sintetizeze glucoza şi poate contribui cu aprox. 30% din glucoza sintetizată în condiţii de înfometare. Alte ţesuturi capabile de gluconeogeneză, dar în măsură mult mai mică, sunt: creierul, muşchii scheletului sau muşchiul inimii. De asemenea celulele epiteliale ale intestinului pot contribui cu aprox. 5% din totalul glucozei formate. Gluconeogeneza din ficat şi rinichi ajută la menţinerea concentraţiei de glucoză din sânge în limite fiziologice, aşa încât creierul şi muşchiul pot extrage de aici suficientă glucoză pentru a-şi acoperi nevoile metabolice.

În calea gluconeogenică, piruvatul este convertit în glucoză. Precursorii neglucidici ai glucozei intră în calea metabolică în special ca piruvat, oxalacetat şi dihidroxiaceton fosfat. Majoritatea precursorilor neglucidici sunt lactatul, aminoacizii şi glicerolul.

a) Lactatul se formează din glucoză prin procesul de glicoliză în celulele musculare active. Piruvatul format din glucoză este convertit în lactat de către LDH (lactat dehidrogenaza). Lactatul este transportat la ficat în ciclul Cori (ciclul acidului lactic) şi convertit în piruvat. Conversia lactatului în piruvat se produce în ficat, reversul se produce în muşchi. Reacţia este catalizată de LDH, o enzimă dependentă de NAD^+ (nicotinamindinucleotid oxidat).

$$\text{Lactat} + NAD^+ \overset{\text{LDH}}{\rightleftarrows} \text{piruvat} + NADH + H^+$$

În ţesuturile neoglicogenice, LDH duce reacţia de obicei în direcţia formării de piruvat în funcţie de raportul $NAD^+/NADH$ şi lactat/piruvat şi de prezenţa izoenzimei LDH.

b) Aminoacizii provin din dieta proteică şi în timpul înfometării din scindarea proteinelor din muşchi. Piruvatul format în muşchi prin glicoliză poate fi convertit de asemenea în alanină printr-o reacţie de transaminare. Alanina este eliberată de muşchi în sânge şi preluată de ficat. În ficat alanina este convertită din nou la piruvat printr-o reacţie de transaminare inversă celei ce se produce în muşchi. Piruvatul este folosit apoi pentru producerea glucozei prin calea gluconeogenezei. Alanina mai poate fi convertită în acid citric şi oxaloacetat. Oxaloacetatul este un intermediar în gluconeogeneză.

c) Glicerolul este format în ţesutul adipos prin lipoliza triacilglicerolului când este puţin „combustibil" pentru nevoile energetice ale organismului. Glicerolul eliberat în sânge este preluat de ficat, unde este fosforilat la 3-fosfoglicerat, un intermediar în calea gluconeogenetică (figura 52).

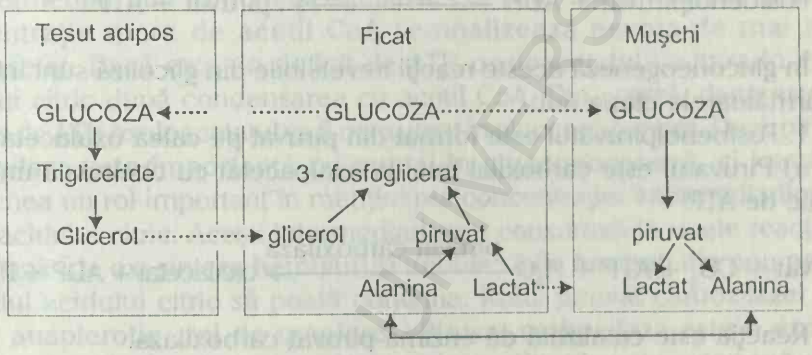


Fig. 52. Interacţiunea dintre căile metabolice ale diferitelor ţesuturi. (Ciclul Cori)

Glicerolul format în ţesutul adipos, lactatul şi alanina formate în ţesutul muscular sunt eliberate în sânge, preluate de ficat şi folosite pentru gluconeogeneză. Glucoza formată în ficat este eliberată în sânge şi preluată de ţesutul muscular unde este folosită pentru glicoliză. În ţesutul adipos glucoza este folosită pentru sinteza trigliceridelor.

Tabelul 12

Substratele pentru gluconeogeneză

Substrate	Intermediarii gluconeogenezei	Procese implicate
Lactat	Piruvat	Ciclul Cori, dehidrogenarea, lipoliza, fosforilare, transaminare
Glicerol	3-fosfoglicerat	
Alanina	Piruvat	Degradare de AA
Alţi aminoacizi	Piruvat, oxaloacetat	Ciclul acidului citric

Gluconeogeneza nu este reversul glicolizei. În glicoliză, glucoza este convertită la piruvat, iar în gluconeogeneză piruvatul este convertit în glucoză. Cu toate acestea gluconeogeneza nu este calea inversă a glicolizei. Sunt solicitate multe reacţii diferite, deoarece echilibrul dinamic al glicolizei este departe de sediul de formare a piruvatului. În glicoliză sunt trei etape esenţiale, ireversibile, catalizate de hexokinază, fosfofructokinază şi piruvatkinază.

$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexokinaza}} \text{Glucoza 6-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructoza 6-fosfat} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{fosfofructokinaza}} \text{fructoza 1,6 bifosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{Fosfoenolpiruvat} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{piruvatkinaza}} \text{piruvat} + \text{ATP}$$

În gluconeogeneză aceste reacţii ireversibile din glicoliză sunt înlocuite cu următoarele etape noi:

1. Fosfoenolpiruvatul este format din piruvat pe calea oxalacetatului.

a) Piruvatul este carboxilat întâi la oxaloacetat cu cheltuiala unei molecule de ATP.

$$\text{Piruvat} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \xrightarrow{\text{piruvat carboxilaza}} \text{oxalacetat} + \text{ADP} + P_i + 2H^+$$

Reacţia este catalizată de enzima piruvat carboxilaza.

b) Oxalacetatul este decarboxilat şi apoi fosforilat pentru a produce fosfoenolpiruvat, cu cheltuiala celei de a doua legături fosfat înalt energetice (GTP) (guanozintrifosfat):

$$\text{Oxalacetat} + \text{GTP} \xrightarrow{\text{fosfoenolpiruvat carboxikinaza}} \text{fosfoenolpiruvat} + \text{GDP} + CO_2$$

Reacţia este catalizată de enzima fosfoenolpiruvat carboxikinaza. Suma acestor două reacţii este:

$$\text{Piruvat} + \text{ATP} + \text{GTP} + H_2O \rightarrow \text{fosfoenolpiruvat} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + 2H^+$$

Constatarea că în mitocondrie se poate forma oxalacetatul din piruvat a condus la descoperirea enzimei piruvatcarboxilaza de către Merton Utter, în 1960. Enzima are proprietăţi catalitice şi alosterice. Gruparea prostetică este biotina, care serveşte ca purtătoare a grupării CO_2 activată. Carboxilul terminal al biotinei este legat de grupul ε amino al unui reziduu specific lizina, printr-o legătură amidă. Biotina este ataşată la piruvat carboxilaza printr-un lanţ flexibil, asemănător cu lipoamida din complexul piruvat dehidrogenaza. Carboxilarea piruvatului necesită ioni de Mg^{2+} şi Mn^{2+} pentru activarea enzimei. Reacţia se petrece în două stadii:

$$\text{Biotin-enzima} + \text{ATP} + HCO_3 \xrightleftharpoons{\text{acetil CoA}} CO_2 + \text{biotin-enzima} + \text{ADP} + P_i$$

$$CO_2 \sim \text{biotin-enzima} + \text{piruvat} \overset{Mn^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{biotin-enzima} + \text{oxaloacetat}$$

Grupul carboxil în carboxibiotin-enzima intermediară este legat la atomul N_1 al inelului biotină. Acest grup carboxil este activat şi apoi transferat de la carboxibiotină la piruvat pentru a forma oxaloacetat. Legătura lungă, flexibilă, dintre biotină şi enzimă, permite grupării prostetice să se rotească de la un *situs* activ al enzimei (ATP-bicarbonat) la alt *situs* (piruvat).

Piruvat carboxilaza este activată de acetil CoA. Biotina nu poate fi carboxilată fără ca acetil CoA să fie legată la enzimă. Activarea alosterică a piruvat carboxilazei de către acetil CoA este un mecanism de control important. Oxalacetatul produs prin reacţia catalizată de piruvat carboxilaza este un intermediar atât în neoglucogeneză, cât şi în calea acidului citric. O concentraţie mare de acetil CoA semnalizează nevoia de mai mult oxaloacetat. Dacă este un deficit de ATP, oxaloacetatul va intra în ciclul acidului citric după condensarea cu acetil CoA. Din contră, dacă este un surplus de ATP, oxaloacetatul va fi consumat în gluconeogeneză. Deci: piruvat carboxilaza este importantă nu numai în gluconeogeneză, ci joacă de asemenea un rol important în menţinerea concentraţiei intermediarilor din ciclul acidului citric. Aceşti intermediari sunt consumaţi în unele reacţii de biosinteză (de ex: sinteza hemului) şi trebuie să fie furnizaţi din nou pentru ca ciclul acidului citric să poată continua. Rolul piruvat carboxilazei este numit anaplerotic „rol de umplere". Piruvat carboxilaza este o enzimă mitocondrială, în timp ce alte enzime din gluconeogeneză sunt citoplasmatice.

Oxaloacetatul, produsul reacţiei catalizate de piruvat carboxilaza, este transportat prin membrana mitocondrială sub formă de malat. El este redus la malat în interiorul mitocondriei de enzima malat dehidrogenază, legată de NADH. Malatul traversează membrana mitocondrială cu ajutorul unui „transportor" şi este reoxidat la oxaloacetat în citozol, de o izoenzimă a malat-dehidrogenazei legată de NAD^+. În citozol, oxaloacetatul este simultan decarboxilat şi fosforilat de fosfoenolpiruvat-carboxilaza. În această etapă este îndepărtat CO_2 adăugat piruvatului de către piruvat carboxilaza; de fapt reacţia este făcută energetică prin decarboxilare şi fosforilare concomitentă. Acest procedeu este folosit în ciclul acidului citric, în calea pentozo-fosfatului, ca şi în biosinteza acizilor graşi.

Oxalacetatul utilizat în citozol pentru glucogenogeneză este format în matricea mitocondrială prin carboxilarea piruvatului. Oxaloacetatul părăseşte mitocondria sub formă de malat, care este apoi reoxidat ca oxaloacetat în citozol (figura 53).

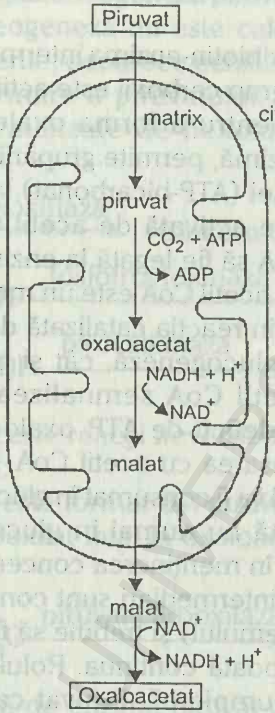


Fig. 53. Formarea oxalacetatului în mitocondrie.

2. Altă reacţie ireversibilă, diferită de calea glicolitică, este formarea fructozo 6-fosfatului. Fructoza 6-fosfatul este format din fructoza 1,6 bifosfat, prin hidroliza esterului fosfat de la C_1. Reacţia este catalizată de fructoza 1,6 bifosfataza şi este o hidroliză exergonică.

Fructoza 1,6 bifosfat + $H_2O \rightarrow$ fructoza 6-fosfat + P_i

3. Glucoza este formată prin hidroliza glucozo 6-fosfatului într-o reacţie catalizată de glucozo 6 - fosfatază.

Glucozo 6 - fosfat + $H_2O \rightarrow$ glucoza + P_i

Glucozo 6 - fosfatul este transportat de o proteină transportoare specifică, din citozol spre lumenul reticulului endoplasmatic, unde este hidrolizat de glucoza 6 - fosfataza, o enzimă legată de membrană. Glucoza şi P_i sunt transportate înapoi în citozol. Glucoza 6-fosfataza nu este prezentă în creier şi muşchi, deci glucoza nu poate fi sintetizată de aceste organe.

Tabelul 13

Diferenţele enzimatice dintre glicoliză şi gluconeogeneză

Glicoliza	Gluconeogeneza
Hexokinaza	Glucozo 6-fosfataza
Fosfofructokinaza	Fructoza 1,6 bifosfataza
Piruvatkinaza	Piruvat carboxilază
	Fosfoenolpiruvat carboxikinaza

Calculul stoechiometric al gluconeogenezei este:

2 piruvat + 4 ATP + 2 GTP + 2 NADH + 6 H_2O → glucoza + 4 ADP + 2 GDP + 6 P_i + 2 NAD+ + 2 H^+

$\Delta G^\circ = -9$ Kcal/mol

Spre deosebire de acesta, calculul stoichiometric al reversului glicolizei este:

2 piruvat + 2 ATP + 2 NADH + 2 H_2O → glucoza + 2 ADP + 2 NAD + 2 P_i

$\Delta G^\circ = +20$ Kcal/mol

În gluconeogeneză, pentru sinteza glucozei din piruvat, sunt folosite 6 legături fosfat înalt energetice, în timp ce în glicoliză, în conversia glucozei în piruvat, sunt generate numai 2 molecule de ATP. Deci, preţul gluconeogenezei este de 4 legături fosfat înalt energetice pentru sinteza glucozei din piruvat. Această energie este necesară pentru a transforma un proces nefavorabil (calea inversă a glicolizei, $\Delta G^{\circ\prime} = +20$ Kcal/mol) într-unul favorabil, cel al gluconeogenezei, $\Delta G = -9$ Kcal/mol.

Gluconeogeneza şi glicoliza se reglează reciproc, aşa încât în timp ce o cale este relativ inactivă, cealaltă este foarte activă. Dacă ambele seturi de reacţie ar fi foarte active în acelaşi timp, rezultatul net ar fi hidroliza a 4 legături fosfat înalt energetice (2 ATP + 2 GTP) pe ciclul de reacţie, în glicoliză şi gluconeogeneză.

Cele două căi metabolice sunt înalt exergonice şi în condiţiile celulare nu ar putea învinge bariera termodinamică. Cu toate acestea, activitatea enzimelor distincte din fiecare cale controlează în aşa fel metabolismul, încât cele două căi să nu aibă activitate maximă în acelaşi timp. Ritmul glicolizei este de asemenea determinat de concentraţia de glucoză şi de ritmul gluconeogenezei, prin concentraţia de lactat şi alţi precursori ai glucozei.

Interconversia fructozo 6-fosfatului şi fructozo 1,6 bifosfatului este punctul cheie de control. AMP stimulează fosfofructokinaza, în timp ce inhibă fructozo-1,6 bifosfataza. Citratul are efect opus. Aceste enzime sunt de

asemenea controlate de fructozo 2,6 bifosfatul care provine din fructozo 6-fosfat şi este „un semnal molecular". Când glucoza este abundentă, se declanşează hormonal cascada care duce la un nivel crescut de 2,6 bifosfat care stimulează fosfofructokinaza şi inhibă fructozo 1,6 bifosfataza; glicoliza este accelerată şi gluconeogeneza încetinită. În timpul înfometării, nivelul fructozo 2,6 bifosfatului scade, fapt ce duce la scăderea activităţii fosfofructokinazei şi creşterea fosfatazei. În consecinţă, fructozo 1,6 bifosfatul este convertită în fructozo 6-fosfat pentru a genera glucoză. Deci: fructoza 2,6 bifosfatul joacă un rol important în determinarea faptului dacă glucoza va fi degradată sau sintetizată. Piruvat kinaza şi piruvat carboxilaza se reglează de asemenea reciproc. Fructoza 1,6 bifosfatul stimulează, iar ATP inhibă piruvat kinaza, în timp ce acetil CoA stimulează şi ADP inhibă piruvat carboxilaza. De asemenea, fosfoenolpiruvat carboxilaza este inhibată de ADP când încărcătura energetică a celulei este mică, în timp ce fluxul fosfoenolpiruvatului şi al gluconeogenezei este favorizat când concentraţia celulară de ATP este mare.

Deficienţele clinice asociate cu gluconeogeneza sunt deficienţele multiple ale carboxilazei. Multe se datorează de obicei unui defect genetic al enzimei holocarboxilaz-sintetaza, care este responsabilă de ataşarea covalentă a biotinei la piruvat carboxilaza şi a celorlalte enzime dependente de biotină (de ex: acetil CoA carboxilaza). Acest sindrom poate să fie produs şi de o deficienţă în biotinază, care îndepărtează biotina din proteină în timpul degradării şi permite ca aceasta să fie folosită în alte căi metabolice. Efecte: deficienţele multiple ale carboxilazei pot duce la cetoacidoză, pierderea părului, retard psihic.

Boala Von Gierke (denumită de asemenea boala stocării de glicogen tip I) este produsă de un defect genetic în G6 - fosfatază. Consecinţe:

a) ficat mărit datorită acumulării excesive a glicogenului, care nu poate fi convertit în glucoză şi eliberat din ficat;

b) hipoglicemia, deoarece ficatul nu poate sintetiza glucoza din glucozo 6-fosfat, deci nu poate elibera glucoză în fluxul sanguin;

c) acidoza lactică se produce deoarece glucoza nu poate fi formată din lactat via piruvat – în consecinţă nivelul lactatului din sânge creşte, o dată cu scăderea pH-ului sanguin –;

d) hiperlipidemia – reducerea producţiei de glucoză are ca rezultat mobilizarea grăsimilor în circuit, fapt ce duce la creşterea concentraţiei de lipide şi acizi graşi în ser;

e) hiperuricemie (concentraţia crescută a produşilor din metabolismul purinelor în ser). Acumularea de glucozo 6-fosfat duce la activarea căii pentozofosfatului, care creşte concentraţia de nucleotide purinice.

Concluzie

Gluconeogeneza este sinteza glucozei din surse neglucidice ca lactatul, aminoacizii şi glicerolul. Multe din reacţiile care convertesc piruvatul în

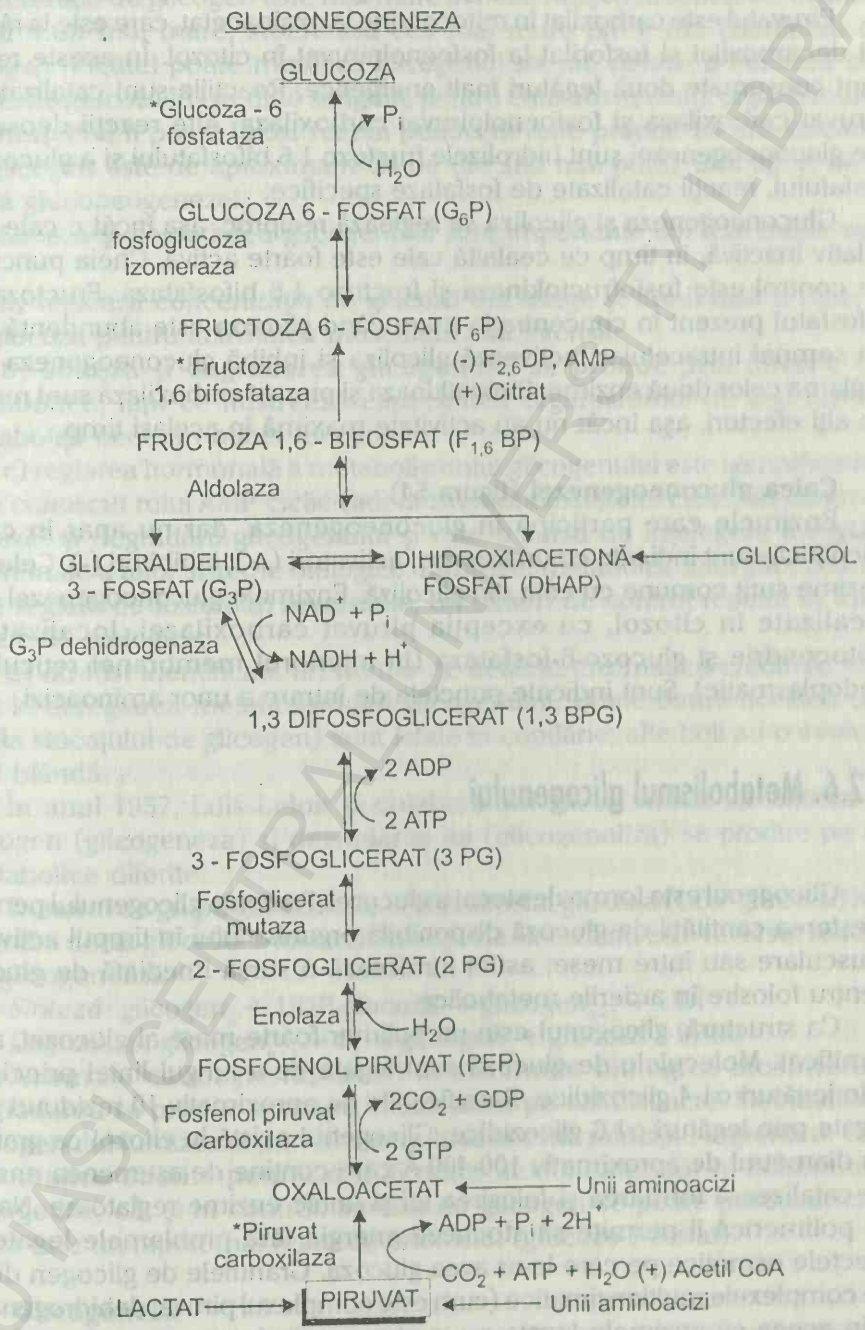


Fig. 54. Calea gluconeogenezei.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

glucoză sunt comune glicolizei. Pentru a trece de reacţiile esenţiale ireversibile din calea glicolitică, gluconeogeneza solicită patru reacţii noi.

Piruvatul este carboxilat în mitocondrie la oxaloacetat, care este la rândul lui decarboxilat şi fosforilat la fosfoenolpiruvat în citozol. În aceste reacţii sunt consumate două legături înalt energetice. Reacţiile sunt catalizate de piruvat carboxilaza şi fosfoenolpiruvat carboxilaza. Alte reacţii deosebite ale gluconeogenezei sunt hidrolizele fructozo 1,6 bifosfatului şi a glucozo 6-fosfatului, reacţii catalizate de fosfataze specifice.

Gluconeogeneza şi glicoliza se reglează reciproc, aşa încât o cale este relativ inactivă, în timp ce cealaltă cale este foarte activă. Cheia punctelor de control este fosfofructokinaza şi fructozo 1,6 bifosfataza. Fructoza 2,6 bifosfatul prezent în concentraţie mare când glucoza este abundentă este un semnal intracelular: activează glicoliza şi inhibă gluconeogeneza prin reglarea celor două enzime. Piruvatkinaza şi piruvat carboxilaza sunt reglate de alţi efectori, aşa încât nu au activitate maximă în acelaşi timp.

Calea gluconeogenezei (figura 54)

Enzimele care participă în gluconeogeneză, dar nu apar în calea glicolitică, sunt indicate cu un asterisc; activatori (+); inhibitori (-). Celelalte enzime sunt comune cu cele din glicoliză. Enzimele gluconeogenezei sunt localizate în citozol, cu excepţia piruvat carboxilazei, localizată în mitocondrie şi glucozo-6-fosfataza (în interiorul membranei reticulului endoplasmatic). Sunt indicate punctele de intrare a unor aminoacizi.

4.2.6. Metabolismul glicogenului

Glicogenul este forma de stocaj a glucozei. Prezenţa glicogenului permite creşterea cantităţii de glucoză disponibilă organismului în timpul activităţii musculare sau între mese; astfel furnizează o sursă imediată de glucoză pentru folosire în arderile metabolice.

Ca structură, glicogenul este un polimer foarte mare al glucozei, mult ramificat. Moleculele de glucoză sunt legate de-a lungul liniei principale prin legături α1,4 glicozidice. Ramificaţiile de aproximativ 10 reziduuri sunt legate prin legături α1,6 glicozidice. Glicogenul există în citozol ca granule cu diametrul de aproximativ 100-400 Å care conţine de asemenea enzime ce catalizează formarea şi folosirea lui şi unele enzime reglatoare. Natura sa polimerică îi permite să stocheze energia fără problemele legate de efectele osmotice pe care le-ar avea glucoza. Granulele de glicogen diferă de complexele multienzimatice (cum este complexul piruvat dehidrogenaza) prin aceea că enzimele legate nu sunt prezente într-o proporţie anumită, deci o granulă de glicogen are structura mai puţin organizată decât un complex multienzimatic.

Locurile de stocare a glicogenului sunt muşchiul şi ficatul. Deşi concentraţia de glicogen este mai mare în ficat, muşchiul scheletic, având o masă mult mai mare, stochează cea mai mare parte din cantitatea de glicogen. Ficatul poate mobiliza glicogenul stocat, pentru a-l elibera sub formă de glucoză în circuitul sanguin, pentru consum în restul organismului, dar muşchiul îl poate folosi numai pentru nevoile proprii. La om stocarea de glicogen este de aproximativ 24 de ore sau mai puţin, fără aport de la calea gluconeogenezei.

Sinteza şi degradarea glicogenului sunt importante din mai multe motive:

a) reglează concentraţia de glucoză din sânge şi furnizează o rezervă de glucoză pentru activitatea musculară mai intensă;

b) sinteza şi degradarea glicogenului se produc prin diferite căi metabolice, fapt ce ilustrează capacitatea organismului de a-şi furniza metaboliţii necesari bunei funcţionări;

c) reglarea hormonală a metabolismului glicogenului este semnificativă. Este cunoscut rolul AMP ciclic (adenozin monofosfatului ciclic) în controlul sintezei şi degradării glicogenului şi este o sursă de înţelegere a reglării hormonale a altor sisteme biologice. Enzimele metabolismului glicogenului sunt reglate de fosforilări reversibile, un sistem de control repetat în toate sistemele biologice;

d) au fost identificate un număr de defecte enzimatice ereditare care duc la dereglarea metabolismului glicogenului. Unele dintre acestea (ex: boala stocajului de glicogen) sunt letale în copilărie; alte boli au o evoluţie mai blândă.

În anul 1957, Luis Leloir şi colaboratorii săi au arătat că sinteza de glicogen (glicogeneza) şi degradarea lui (glicogenoliza) se produc pe căi metabolice diferite.

Donorul de grupe glicozil este uridin difosfat glucoza (UDP-glucoza) mai degrabă decât glucozo-1-fosfatul. Reacţia de sinteză nu este reversul reacţiei de glicogenoliză.

Sinteză: $\text{glicogen}_n + \text{UDP-glucoză} \rightarrow \text{glicogen}_{n+1} + \text{UDP}$

Degradare: $\text{glicogen}_{n+1} + P_i \rightarrow \text{glicogen}_n + \text{glucoză 1-fosfat}$

Acum se cunoaşte faptul că în sistemele biologice biosinteza şi degradarea se produc aproape întotdeauna pe căi distincte. Metabolismul glicogenului furnizează primul exemplu al acestui principiu important. Căile metabolice diferite permit o mai mare flexibilitate atât în schimburile energetice, cât şi în control. Sinteza de glicogen se poate produce, chiar dacă este un raport mai mare de ortofosfat (glucozo 1-fosfat).

Glicogeneza

În glicogeneză donorul de glucoză este UDP, o formă activată a glucozei (aşa cum ATP şi acetil CoA sunt forme activate ale ortofosfatului şi acetatului).

Atomul de carbon C_1 al unităţii glicozil al UDP-glucoza este activat, deoarece gruparea sa hidroxil este esterificată la nucleul difosfat al UDP.

UDP-glucoza este sintetizată din glucoză 1-fosfat şi uridin trifosfat (UTP) (glucoza 1-fosfatul provine din glucoza 6-fosfat prin acţiunea fosfoglucomutazei). Reacţia de formare a UDP glucozei este catalizată de UDP glucozo pirofosforilaza. Sinteza UDP glucozei, exemplifică faptul că multe reacţii de biosinteză din organism sunt reglate de hidroliza pirofosfatului. Alt aspect al acestei reacţii are o semnificaţie clară: nucleozid difosfat glucoza serveşte ca donor de grupări glicozil pentru biosinteză multor dizaharide şi polizaharide. Reacţia de formare a UDP glucozei este reversibilă, dar hidroliza pirofosfatului anorganic (PP_i) de către pirofosfatazele celulare, o face practic ireversibilă.

Sinteza glicogenului solicită prezenţa unui lanţ de glicogen existent şi reziduurile glicozil de la UDP-glucoză. Reziduurile sunt transferate succesiv prin legături α1,4 glicozidice la C_1 terminal al unui lanţ de glicogen existent.

$$\text{UDP-glucoza} + \text{glicogen ca reziduuri} \xrightarrow{\text{glicogen sintetaza}} \text{UDP} + \text{glicogen}_{(n+1\ \text{reziduuri})}$$

Această reacţie, care este etapa limitatoare în sinteza de glicogen, este catalizată de enzima glicogen sintaza; sintaza este o enzimă ce catalizează o reacţie de sinteză în care două unităţi sunt unite fără participarea directă de ATP sau alt nucleozid-trifosfat. Glicogen sintaza catalizează numai sinteza legăturilor α1,4 glicozidice. Sunt necesare alte enzime pentru a forma legături α1,6 care fac din glicogen un polimer ramificat. Ramificarea este importantă deoarece aceasta măreşte gradul de solubilitate a glicogenului şi creează un mare număr de reziduuri terminale, care sunt locurile de acţiune a enzimei glicogen fosforilaza şi a sintazei. Ramificarea se produce după ce un număr de reziduuri glicozil sunt unite prin legături α1,4 şi formarea unei legături α1,6 (reacţia este diferită de reacţia de debranşare). Enzima responsabilă pentru formarea ramificaţiilor glicogenului este glicozil 1,6 transferaza, numită de asemenea şi „enzima de branşare". La formarea ramificaţiilor, un bloc de 7 reziduuri ale lanţurilor terminale sunt transferate la un *situs* mai interior, la hidroxilul C_6 al reziduului glicozil, care este cu cel puţin 4 reziduuri mai departe de o ramificaţie existentă. O ramificaţie terminală poate fi de cel puţin 11 reziduuri lungime, pentru ca un segment de 7 reziduuri să poată fi transferat de la ea. Glicogenul este o formă foarte eficientă de stocare a glucozei.

Pentru evaluarea consumului de energie pentru conversia glucozo 6-fosfatului în glicogen şi înapoi în glucozo 6-fosfat au fost descrise multe reacţii:

1. Glucoza 6-fosfat $\rightarrow$ glucoză 1-fosfat
2. Glucoza 1-fosfat + UTP $\rightarrow$ UDP-glucoză + PP_i
3. $PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$
4. UDP glucoza + $\text{glicogen}_n \rightarrow \text{glicogen}_{(n+1)}$ + UDP
5. UDP + ATP $\rightarrow$ UTP + ADP

Suma: Glucoza 6-fosfat + ATP + $\text{glicogen}_n + H_2O \rightarrow \text{glicogen}_{n+1}$ + ADP + $2P_i$

Regenerarea UTP se face prin fosforilare cu ATP printr-o reacţie catalizată de nucleozid difosfokinaza. Deci: în încorporarea glucozo 6-fosfatului în glicogen este consumată o legătură fosfat înalt energetică. Energia obţinută prin scindarea glicogenului este foarte eficientă. Aproximativ 90% din reziduuri sunt clivate prin fosforilare la glucoza 1-fosfat, care este convertit fără cheltuială de energie în glucoza 6-fosfat. Alte 10% sunt reziduuri de ramificaţie, care sunt clivate prin hidroliză. Pentru fosforilarea unei molecule de glucoză, la glucoza 6-P este consumată o moleculă de ATP. Oxidarea completă a moleculei de glucozo 6-P produce aprox. 37 de moli ATP şi stocajul consumă puţin mai mult de 1 mol ATP pe molecula de G_6P, aşa încât eficienţa stocajului este de aproximativ 97%.

Glicogenoliza

Calea de scindare a glicogenului a fost elucidată de studiile lui Carl Cori şi ale lui Gerty Cori. Ei au arătat că glicogenul este clivat de ortofosfat, pentru a da un glucid fosforilat, identificat cu glucoza 1-fosfatul. Cei doi cercetători au izolat şi cristalizat enzima care catalizează această reacţie: glicogen-fosforilaza.

$$\underset{\text{(n reziduuri)}}{\text{Glicogen} + P_i} \rightleftarrows \underset{\text{(n-1 reziduuri)}}{\text{glucoza 1-fosfat + glicogen}}$$

Fosforoliza este clivajul unei legături cu ajutorul ortofosfatului, spre deosebire de hidroliză, care se referă la clivajul prin H_2O. Fosforilaza catalizează îndepărtarea unui reziduu glicozil de la capătul nereducător al moleculei de glicogen. Legătura glicozil dintre C_1 al reziduului terminal şi C_4 al reziduului adiacent este scindată prin ortofosfat. Enzima care catalizează reacţia este glicogen-fosforilaza, un dimer care utilizează piridoxal fosfatul drept grupare prostetică. Glicogen fosforilaza are izoenzime în diferite ţesuturi. Reacţia de clivaj fosforolitic este limitatoare. Deşi reacţia catalizată de fosforilază este reversibilă în *vitro*, în organism se produce cu toate acestea în direcţia clivajului de glicogen, deoarece raportul $[P_i]$/glucoză 1-fosfat este de obicei mai mare de 100. Clivajul fosforolitic al glicogenului este avantajos, deoarece glucidul eliberat este fosforilat, spre deosebire de clivajul hidrolitic, care ar produce glucoză ce ar trebui fosforilată cu cheltuială de ATP, ca să poată intra în circuitul glicolitic.

Un alt avantaj al fosforolizei pentru celula musculară este acela că glucozo 1-fosfatul ionizat nu poate difuza în afara celulei, pe când glucoza poate. Acesta este un exemplu al importanţei ca metabolitul să fie ionizat.

Fosforilaza degradează glicogenul numai limitat, deoarece legăturile α1,6 nu sunt clivate de această enzimă; într-adevăr, ea îşi încetează activitatea de clivare a legăturilor α1,4 atunci când întâlneşte un reziduu la distanţa de patru reziduuri depărtare de punctele de ramificare. Pentru aceste legături este solicitată o activitate enzimatică nouă. O transferază mută un bloc de 3 reziduuri glicozil de la o ramură exterioară la alta. Acest transfer expune

reziduul rămas la acţiunea unei a treia enzime de degradare α1,6 glucozidaza, cunoscută de asemenea ca „enzima de debranşare". Această enzimă hidrolizează legătura α1,6 glucozidică. Transferaza şi 1,6 glucozidaza (enzima de debranşare) transformă structura ramificată a glicogenului într-o structură lineară, care poate fi clivată mai departe de glicogen fosforilază. Este demn de observat că transferaza şi α1,6 glucozidaza sunt părţi componente ale aceleeaşi enzime şi că un singur lanţ polipeptidic de 160 Kd conţine două centre active. Enzima care catalizează transformarea glucozo 1-fosfat în glucozo 6-fosfat este fosfoglucomutaza. Centrul catalitic al moleculei de enzimă activă conţine un reziduu de serină fosforilată. În timpul catalizei, această grupare fosforil este transferată probabil la grupul hidroxil al carbonului C_6 al glucozei 1-fosfatului, pentru a forma glucoza 1,6 bifosfat. Acest intermediar transferă apoi grupul său C_1 fosforil la reziduul serină din centrul activ al enzimei. Rezultatul este formarea de glucozo 6-fosfat şi regenerarea fosfoenzimei. Aceste reacţii sunt similare cu cele ale fosfogliceromutazei, o enzimă glicolitică.

Rolul 2,3 bifosfogliceratului în interconversia 2 fosfogliceratului şi 3 fosfogliceratului este asemănător cu cel al 1,6 bifosfatului în interconversia fosfoglucozelor. În ambele reacţii participă o fosfoenzimă intermediară. Gruparea fosforil de pe fosfoglucomutază este pierdută prin hidroliză, dar este redobândită prin transferul de la glucoza 1,6 bifosfatul format din glucoza 1-fosfat şi ATP în reacţia catalizată de fosfoglucokinază.

Ficatul are o funcţie majoră în menţinerea relativ constantă a concentraţiei de glucoză din sânge. În timpul activităţii musculare şi în intervalul dintre mese, ficatul eliberează glucoza în sânge. Glucoza eliberată este preluată în primul rând de creier şi muşchiul scheletic. Glucoza fosforilată, spre deosebire de glucoză, nu poate difuza cu uşurinţă. Ficatul conţine o enzimă hidrolitică, glucozo 6-fosfataza, care face posibilă difuzarea glucozei. Glucozo-6-fosfataza este localizată în membrana reticulului endoplasmatic şi este una dintre enzimele esenţiale în gluconeogeneză.

$$\text{glucoza 6-fosfat} + H_2O \rightarrow \text{glucoza} + P_i$$

Glucozo 6-fosfataza este prezentă de asemenea în rinichi şi intestin, dar este absentă în muşchi şi creier. În consecinţă, glucoza 6-fosfatul este reţinut de muşchi şi creier, care are nevoie de o cantitate mare din această substanţă necesară pentru generarea de ATP. În concluzie, glucoza nu este un combustibil major pentru ficat; mai degrabă ficatul stochează şi eliberează glucoza în folosul altor ţesuturi.

Existenţa unor căi metabolice diferite pentru sinteza şi degradarea glicogenului, înseamnă că ele trebuie să fie riguros controlate, altfel ATP ar fi repede hidrolizat. În organism, acest lucru nu se poate produce datorită faptului că sinteza glicogenului şi degradarea lui sunt coordonate în aşa fel, încât sinteza glicogenului este aproape inactivă atunci când fosforilaza este în plină activitate şi invers.

Reglarea hormonală a metabolismului glicogenului este foarte importantă. Insulina (un hormon polipeptidic) creşte capacitatea ficatului de a sintetiza glicogenul şi descreşte glicogenoliza printr-un mecanism care nu este încă bine elucidat. Probabil intervine prin mărirea cantităţii de glucoză care intră în celulele musculare şi prin reducerea concentraţiei de cAMP prin activarea fosfodiesterazei, enzimă ce catalizează distrugerea de cAMP. Mai bine cunoscut este modul de acţiune a epinefrinei şi a glucagonului care au efecte opuse insulinei. Activitatea musculară duce la eliberarea epinefrinei din medulara suprarenală. Epinefrina stimulează glicogenoliza în muşchi şi mai puţin în ficat. Ficatul este mai responsabil de activitatea glucagonului, un hormon polipeptid, secretat de celulele α le pancreasului, atunci când concentraţia de glucoză din sânge este scăzută. Hormonul creşte concentraţia de glucoză din sânge prin stimularea scindării glicogenului în ficat.

Earl Sutherland a descoperit că acţiunea epinefrinei şi a glucagonului sunt mediate de AMP ciclic. Această importantă descoperire a dus la recunoaşterea că AMP ciclic este omniprezent în toate eucariotele şi joacă un rol cheie în controlul proceselor biologice.

Sinteza de AMP ciclic este catalizată de enzima adenilat ciclaza asociată cu membrana plasmatică. Sinteza acestei molecule reglatoare provenită din ATP este accelerată printr-o hidroliză ulterioară a pirofosfatului. Epinefrina şi glucagonul nu intră în celulă, ci se leagă de receptori specifici de pe suprafaţa membranei plasmatice. Complexele de receptor-hormon activează adenilat ciclaza prin sistemul hormon AMP ciclic. Reacţiile în cascadă leagă AMP ciclic de enzimele cheie ale metabolismului glicogenului. O concentraţie adecvată de cAMP stimulează formarea glicogen sintazei D (forma inactivă) şi a formei active a fosforilazei (fosforilaza a). În aceste condiţii glicogeneza este limitată şi glicogenoliza este crescută.

La o concentraţie scăzută a cAMP, predomină forma activă (I) a glicogen sintazei, în acelaşi timp forma activă a fosforilazkinazei este scăzută, deoarece enzima de fosforilare, proteinkinaza, dependentă de cAMP este inactivă. În aceste condiţii glicogeneza este crescută şi glicogenoliza este scăzută.

Fosforilazkinaza (enzima care activează fosforilaza) este sub control dual: poate fi convertită dintr-o formă puţin activă într-o formă cu activitate mare, prin fosforilare, datorită unei componente a sistemului AMP ciclic-hormon. De asemenea poate fi activată parţial de ionii de calciu. Acest mod de activare a kinazei este important în muşchi unde contracţia se produce prin eliberare de Ca^{2+}, deci glicogenoliza şi contracţia musculară sunt coordonate printr-o creştere tranzitorie a Ca^{2+} în citozol.

Sinteza glicogenului este strâns legată de degradarea lui. Activitatea glicogen sintazei este reglată ca şi cea a fosforilazei prin modificări covalente.

Glicogen fosforilaza există în două forme: a) forma activă (fosforilaza a) este forma fosforilată a enzimei; b) forma inactivă, denumită fosforilaza b, este forma defosforilată a enzimei. În cazul glicogen sintazei, fosforilarea

converteşte forma activă a enzimei (a) într-o formă de obicei inactivă (b). Forma b a glicogen sintazei solicită o concentraţie mare de glucoza 6-fosfat pentru activitate, în timp ce forma defosforilată este activă atât în prezenţa glucozo 6-fosfatului, cât şi în absenţa lui. Deci: fosforilarea are efecte opuse asupra activităţii enzimatice a glicogen sintazei şi a fosforilazei.

În concluzie fosforilarea celor două enzime (fosforilazkinaza şi glicogen sintaza) stă la baza reglării gliconeogenezei şi glicogenolizei. O cascadă de reacţii controlează fosforilarea astfel:

În muşchiul scheletic

a) Hormoni ca epinefrina şi glucagonul se leagă la receptori în membrana plasmatică a celulelor ţintă şi declanşează activarea adenilat ciclazei.

b) Adenilat ciclaza catalizează în membrana plasmatică formarea cAMP din ATP.

c) Creşterea concentraţiei intracelulare de AMP ciclic, activează o proteinkinază, prin legare alosterică.

d) Această proteinkinază activată fosforilează cele două enzime: fosforilazkinaza şi glicogen sintază.

Efectele fosforilării sunt diferite: activarea fosforilazkinazei stimulează glicogenoliza în timp ce fosforilarea glicogen sintazei favorizează sinteza de glicogen (figura 55).

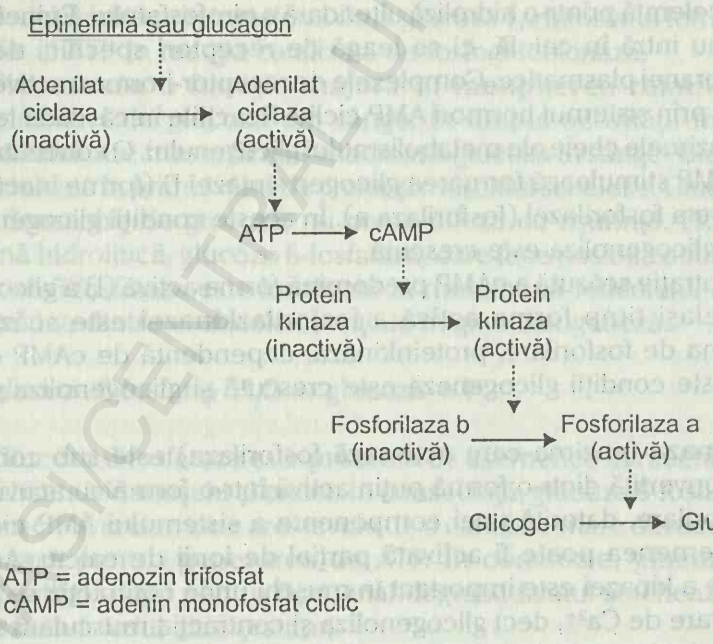


Fig. 55. Cascada reglării activităţii glicogen fosforilazei în muşchi.

În ficat:

Glucagonul activează adenilat ciclaza în membranele celulei hepatice, activează glicogenoliza şi reduce glicogeneza. Insulina creşte glicogenoliza

prin mărirea activităţii glicogen sintazei printr-un mecanism neelucidat încă. Se pare că raportul glicogen/insulină este mai important decât valoarea fiecărui hormon în parte, deoarece metabolismul glicogenului este puternic influenţat de hormonul predominant:

a) dacă predomină insulina, aceasta întreţine stocajul glicogenului după masă;

b) dacă predomină glucagonul, acesta mobilizează glicogenul din ficat şi concentraţia glucozei din sânge scade.

Rolul cAMP este esenţial asupra enzimelor implicate în sinteza şi degradarea glicogenului:

a) o concentraţie corespunzătoare de cAMP limitează glicogeneza şi măreşte glicogenoliza;

b) o concentraţie scăzută de cAMP duce la creşterea glicogenezei şi la scăderea glicogenolizei (figura 56).

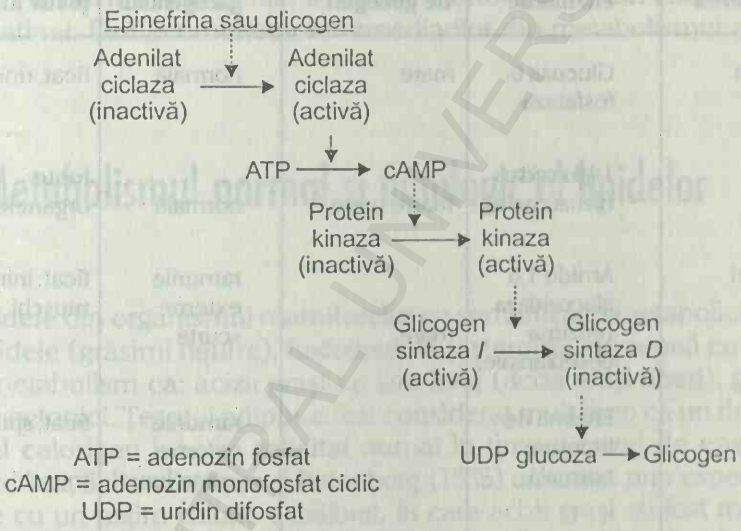


Fig. 56. Cascada reglării activităţii glicogen fosforilazei în ficat.

Bolile cu stocaj de glicogen sunt cauzate de defecte genetice ce au ca rezultat deficienţa unor enzime din metabolismul glicogenului. Aceste deficienţe conduc la o acumulare excesivă de glicogen şi/sau imposibilitatea de a folosi acest glicogen în circuitul metabolic. Prima boală cu stocaj de glicogen a fost descrisă de Edgar von Gierke, în 1929. Un bolnav cu această boală are un abdomen enorm datorită măririi ficatului. Între mese aceşti bolnavi au o hipoglicemie pronunţată, mai mult, nivelul glucozei din sânge nu creşte după administrare de epinefrină sau glucagon. Din cauza glicemiei scăzute, copiii cu această boală pot avea convulsii. Defectul enzimatic al acestei boli a fost elucidat în anul 1952 de Cori, care a găsit că din ficatul bolnavilor lipseşte enzima glucoza 6-fosfataza. Glicogenul este normal ca structură, dar este într-o cantitate anormal de mare. A fost descrisă pentru prima dată deficienţa ereditară a unei enzime hepatice. Absenţa glucozo 6-

fosfatazei din ficat produce hipoglicemia, deoarece glucoza nu se poate forma din glucozo 6-fosfat. Glucidul fosforilat nu poate traversa membrana plasmatică, deci nu poate părăsi ficatul. Creşterea compensatoare a glicolizei din ficat, duce la un nivel crescut de lactat şi piruvat în sânge. Bolnavii prezintă şi dereglări ale metabolismului lipidic.

Cauzele şi caracteristicile mai multor boli cu stocaj de glicogen sunt redate în tabelul 14. Cori a elucidat defectele biochimice şi în altă boală cu stocaj de glicogen (tipul III), care nu poate fi deosebită de boala von Gierke

Tabelul 14

Bolile genetice ale metabolismului glicogenului

Tipul bolii şi denumirea	Defectul enzimatic	Concentraţia de glicogen	Structura glicogenului	Principalul ţesut afectat
I Boala von Gierke	Glucoza 6-fosfataza	mare	normală	ficat, rinichi
II Boala Pompe	1,4glucozidaza (lizozomală)	foarte mare	normală	toate organele
III Boala Cori	Amido 1,6 glucozidaza (enzima de debranşare)	mare	ramurile externe scurte	ficat, inimă, muşchi
IV Boala Andersen	Enzima de branşare normală		ramurile externe foarte lungi	ficat, splină, muşchi
V Boala Mc Ardle	Fosforilaza	mare (moderat crescut)	normală	muşchi
VI Boala lui Hers	Fosforilaza	mare	normală	ficat
VII Boala Tarui	Fosfofructokinaza	mare	normală	muşchi
VIII	Fosforilazkinaza	mare	normală	ficat

Notă: tipurile I-VII sunt ereditare recesiv autosomale, tipul VIII este legat de sex.

BCU "ASCENTA" UNIVERSITY LIBRARY

numai prin examen clinic. În tipul III structura glicogenului hepatic şi muscular este anormală şi cantitatea este mult crescută. Cea mai izbitoare particularitate este aceea că ramurile externe ale glicogenului sunt foarte scurte. Bolnavilor le lipseşte enzima de debranşare (α1,6 glucozidaza), aşa încât pot fi utilizate efectiv numai ramurile cele mai externe ale glicogenului, deci, numai o mică fracţiune din acest glicogen anormal poate fi folosită.

Un defect în metabolismul glicogenului muscular se găseşte în Boala lui Mc Ardle, în care activitatea fosforilazei musculare este absentă. Bolnavii nu au capacitatea de a efectua exerciţii fizice susţinute din cauza crampelor musculare, deşi sunt normal şi bine dezvoltaţi fizic. Studii de rezonanţă magnetică nucleară (NMR) au arătat că spre deosebire de persoanele sănătoase la care pH-ul celulelor musculare scade după un exerciţiu fizic susţinut, ca rezultat al acumulării de acid lactic, la bolnavii cu maladia Mc Ardle, pH-ul devine mai alcalin în timpul efortului fizic, din cauza scindării fosfocreatinei, fără acumularea intermediarilor din metabolismul glicolitic.

4.3. Metabolismul normal și patologic al lipidelor

Lipidele din organismul mamiferelor cu semnificaţie metabolică includ: trigliceridele (grăsimi neutre), fosfolipidele şi steroizii, împreună cu produşii lor de metabolism ca: acizii graşi cu lanţ lung (acizii graşi liberi), glicerolul şi corpii cetonici. Ţesutul adipos a fost considerat mult timp ca un depozit de material calorigen inactiv, solicitat numai în timpul crizei de energie. Cu toate acestea, Schoenheimer şi Rittenberg (1935) au arătat prin experienţe pe animale cu un regim caloric echilibrat, în care acizii graşi au fost marcaţi cu deuteriu, că o proporţie considerabilă din depozitul de lipide a fost formată de grăsimile din dietă. În timpul acestei perioade, o cantitate corespunzătoare din masa totală de lipide din depozitul care rămâne constant este formată din lipidele care au fost mobilizate. Aceste investigaţii au demonstrat starea dinamică a corpilor graşi din organism, fapt ce ne ajută să înţelegem metabolismul lor.

Multe glucide din dietă sunt convertite în lipide, înainte ca acestea să fie utilizate pentru furnizare de energie. În consecinţă, acizii graşi pot fi sursă majoră de energie pentru multe ţesuturi unde pot fi folosiţi ca material energetic preferat glucidelor. Ca formă principală de stocare a energiei în corp, grăsimile sunt avantajoase faţă de glucide şi proteine, pentru că valoarea lor calorică este de peste două ori mai mare faţă de celelalte forme de stocare (9,8 cal/kg) şi sunt forma de stocare cea mai concentrată a energiei potenţiale deoarece sunt asociate cu mai puţină apă în depozit.

În dietă este necesară o cantitate minimă de grăsime pentru a acoperi necesarul unor acizi graşi nesaturaţi (acizi graşi esenţiali) şi a vitaminelor solubile în lipide, care nu pot fi sintetizate în cantitatea adecvată pentru

funcţionarea optimă a organismului. Ca transportori ai unor compuşi esenţiali, lipidele din dietă sunt necesare pentru absorbţia eficientă a acestor compuşi din tractusul gastrointestinal. Ca sursă de energie, lipidele pot fi înlocuite complet de glucide sau de proteine, deşi eficienţa cu care sunt utilizaţi aceştia poate suferi. Extragerea lipidelor plasmatice cu ajutorul solvenţilor potriviţi urmată de separare, a pus în evidenţă prezenţa următorilor compuşi — trigliceride, fosfolipide, colesterol liber şi esterificat — şi, în plus, existenţa unor fracţiuni mult mai mici de lanţuri lungi de acizi graşi liberi (neesterificaţi) (AGL), care reprezintă cam 5% din cantitatea de acizi graşi prezentă în plasmă. Această fracţiune este cea mai activă dintre toate cele plasmatice, din punct de vedere metabolic. Problema constă în transportul acestui material înalt energetic hidrofob, prin mediul apos înconjurător. Rezolvarea s-a obţinut prin asocierea celor mai insolubile lipide cu moleculele cele mai polare (ca în fosfolipide) şi combinarea lor cu proteinele, pentru a forma complexele lipoproteice hidrofobe. Pe această cale, trigliceridele provenite din absorbţia intestinală sau de la ficat sunt transportate în sânge sub formă de chilomicroni şi lipoproteine cu densitate foarte mică. Grăsimile sunt eliberate din ţesutul adipos sub formă de acizi graşi liberi, care sunt transportaţi în plasmă sub formă de complexe albumină-acizi graşi. Multe categorii de lipide sunt transportate în sânge ca lipoproteine. Grăsimea pură are densitatea mai mică decât apa; rezultă că raportul dintre lipide şi proteine creşte în structura lipoproteinelor cu cât densitatea descreşte.

Acizii graşi sunt o clasă de compuşi care conţine un lanţ glucidic lung şi un grup carboxilat terminal. În organism acizii graşi au trei roluri fiziologice majore: reprezintă un material de sinteză a fosfolipidelor şi glicolipidelor, componente importante ale membranelor biologice; derivaţi ai acizilor graşi servesc ca hormoni şi mesageri intracelulari; acizii graşi sunt combustibil molecular. Ei sunt stocaţi ca trigliceride, care sunt esteri ai glicerolului. Triglicerolii sunt numiţi grăsimi neutre sau trigliceride.

Evenimentul iniţial în utilizarea grăsimilor ca sursă de energie este hidroliza triglicerolului de către enzima lipază.

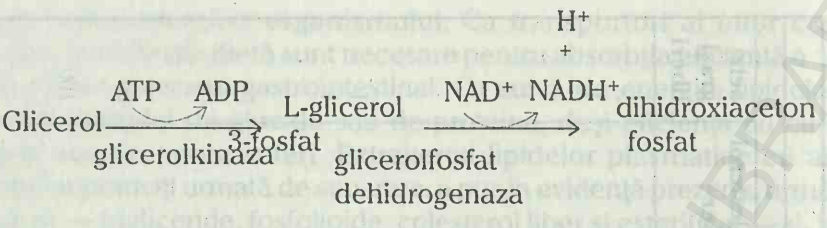
$$\text{Triglicerid} \xrightarrow{\text{lipaza}} \text{Glicerol} + \text{Acizi graşi}$$

Activitatea lipazei din celulele adipoase este reglată hormonal. Epinefrina, norepinefrina, glucagonul şi hormonul adeno-corticotropic stimulează adenilat ciclaza din celulele adipoase. Nivelul crescut al adenozintrifosfatului ciclic (AMPc) stimulează o proteinkinază care activează lipaza prin fosforilare. Epinefrina, norepinefrina, glucagonul şi hormonul adeno-corticotropic produc lipoliza. Al doilea mesager în activarea lipolizei în celulele adipoase este AMP ciclic (AMPc). Rolul său este analog cu cel avut în activarea scindării glicogenului. Spre deosebire de aceşti factori care stimulează lipoliza, insulina o inhibă. Glicerolul format în lipoliză este fosforilat şi oxidat la dihidroxiacetonfosfat, care la rândul său este izomerizat la gliceraldehid-3 fosfat. Acest intermediar este prezent atât în calea glicolitică, cât şi în calea gluconeogenică.

Compoziţia lipoproteinelor din plasmă

Fracţiunea	Sursa	Densitatea	Compoziţia procentaj din lipide totale						
			proteine %	lipide totale %	trigliceride	fosfolipide	colesterol esterificat	colesterol liber	acizi graşi liberi
Chilomicroni	intestin	<0,96	1	99	88	8		1	-
Lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL)	ficat şi intestin	0,96-1,006	7	93	56	20	3 15	8	1
Lipoproteine cu densitate mică	ficat şi intestin								
LDL 1		1,006-1,019	11	89	29	26		9	1
LDL 2		1,019-1,063	21	79	13	28	34 48	10	1
Lipoproteine cu densitate mare	ficat şi intestin								
HDL 1		1,063-1,125	33	67	16	43		10	-
HDL 2		1,125-1,210	57	43	13	46	31 29	6	6
Albumine-acizi graşi	ţesut adipos	>1,281	99	1	0	0	0	0	100

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Pe de altă parte, glicerolul poate fi convertit în piruvat sau glucoză în ficat, unde există enzimele potrivite. Procesul invers se poate produce prin reducerea dihidroxiaceton fosfatului la glicerol 3-fosfat. Acesta, hidrolizat de către o fosfatază dă glicerolul. Glicerolul şi intermediarii glicolitici rezultaţi pot fi interconvertiţi cu uşurinţă.

Acizii graşi sunt degradaţi prin îndepărtarea secvenţială a două unităţi de carbon. În anul 1904, Franz Knoop a avut o contribuţie importantă la elucidarea mecanismului de oxidare a acizilor graşi. El a hrănit câini cu acizi graşi cu lanţuri drepte în care carbonul a fost legat la un grup fenil. Knoop a găsit că urina acestor câini conţine un derivat de acid fenilacetic dacă a hrănit câini cu fenilbutirat. În contrast, când ei au fost hrăniţi cu fenilpropionat, în urină a fost găsit un derivat al acidului benzoic. De fapt, acidul fenilacetic a fost produs dacă acizii graşi din hrană conţineau un număr par de atomi de C, în timp ce acidul benzoic s-a format în cazul acizilor graşi cu un număr impar de C. Aceste experienţe sunt foarte importante în biochimie, deoarece s-a folosit pentru prima dată un marcaj sintetic pentru a elucida un mecanism de reacţie. Deuteriu şi radioizotopii au pătruns în experienţele biochimice mult mai târziu. Rezultatele au sugerat că acizii graşi cu grupări (cofenil) sunt degradaţi prin îndepărtarea pe cale oxidativă a unor fragmente de doi atomi de carbon, succesiv, pornind de la capătul carboxilic.

Eugene Kennedy şi Albert Lehninger (SUA) au arătat, în anul 1949, că la oxidarea acizilor graşi este nevoie de ATP şi au dovedit că acizii graşi sunt activaţi enzimatic la gruparea carboxil. Lehninger a descoperit de asemenea că acizii graşi sunt oxidaţi pentru a da unităţi de câte doi carboni care pot intra în ciclul acidului tricarboxilic. E.V. Kennedy şi A.L. Lehninger au arătat că oxidarea acizilor graşi are loc exclusiv în mitocondrie. Alte experienţe importante care au dus la recunoaşterea naturii treptelor enzimatice ale oxidării acizilor graşi au fost cele a lui F. Lynen şi colegilor săi din Germania. Ei au arătat că activarea acizilor graşi dependentă de ATP implică esterificarea lor cu gruparea tiolică a coenzimei A, pentru a forma un derivat al acil-CoA şi că toate treptele de oxidare următoare au loc cu acidul gras aflat sub forma tioesterului său cu coenzima A. Enzimele care catalizează treptele respective au fost izolate şi purificate în laboratoarele lui Lynen, S. Ochoa, D.E. Green şi alţi cercetători.

Reacţia de activare (formarea legăturii tioester între gruparea carboxil a acidului gras şi grupul sulfhidril al CoA), dependentă de ATP, are loc pe membrana externă a mitocondriei şi este catalizată de acil-CoA sintetaza (numită de asemenea tiokinaza acidului gras).

$$R\text{–}COO^- + CoA + ATP \rightleftarrows \text{acil CoA} + AMP + PP_i$$

Este scindată o legătură înalt energetică (între PP_i şi AMP) şi se formează o legătură înalt energetică (legătura tioester în acil CoA). În continuare pirofosfatul este hidrolizat rapid de o pirofosfatază. Aceasta face reacţia ireversibilă deoarece sunt consumate două legături înalt energetice şi se formează numai una. Aici vedem un alt exemplu al unei teme ce se repetă în biochimie: multe reacţii biochimice sunt făcute ireversibile prin hidroliza unui pirofosfat anorganic.

Alt motiv care se repetă este reacţia de activare. Intermediarul enzima-acil adenilat nu este unic în sinteza de acil-CoA. Acil-adenilaţii sunt formaţi frecvent când grupările carboxil sunt activate în reacţiile biochimice. De ex: aminoacizii sunt activaţi printr-un mecanism asemănător în sinteza de proteine.

Efectul net al acestei etape este folosirea a două legături de ATP macroergice pentru a activa o moleculă de acid gras. AMP-ul format ca al doilea produs al reacţiei catalizate de acil-CoA sintetaza este refosforilat la ADP de enzima adenilat kinază.

$$ATP + AMP \rightarrow 2\ ADP$$

Acizii graşi saturaţi cu catena lungă au o capacitate limitată de a traversa membrana internă sub forma tioesterilor lor cu CoA, dar intrarea lor este mult uşurată de carnitină, un compus format din lizină. Acizii graşi sunt activaţi pe membrana mitocondrială externă, în timp ce oxidarea lor are loc în matricea mitocondrială. Grupul acil este transferat de la atomul de sulf al CoA la gruparea hidroxil a carnitinei pentru a forma acil-carnitina, reacţie catalizată de carnitin-acil transferaza I, care este localizată pe faţa citozolică a membranei mitocondriale interne. Esterul acil-carnitina astfel format trece apoi prin membrana internă în matrice printr-un sistem de transport specific, cu ajutorul enzimei translocaza. În ultima etapă a procesului de intrare, gruparea acil este transferată de la carnitină înapoi la CoA intramitocondrială prin acţiunea enzimei carnitin acil transferazei II, localizată pe suprafaţa interioară a membranei interne. Reacţia este posibilă din punct de vedere termodinamic, deoarece legătura acil-O din carnitină are un potenţial de transfer mare. În final, carnitina se reîntoarce la sediul său în citozol, în schimbul unei molecule de acilcarnitină care intră. Reacţia este catalizată de o translocază (figura 57).

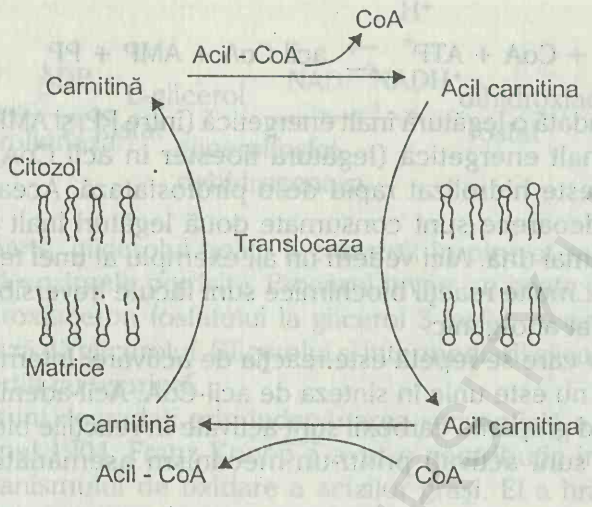


Fig. 57. Intrarea acilcarnitinei în matricea mitocondrială mediată de translocază.

Acest mecanism complex de intrare, denumit adesea „naveta acizilor graşi", are ca efect păstrarea cantităţilor extramitocondriale şi intramitocondriale de CoA şi acizi graşi separate. Acil-CoA a acizilor graşi, intramitocondrială, devine acum substratul unui sistem de oxidare a acizilor graşi, care este situat în compartimentul matriceal intern. Un defect al transferazei sau al translocazei sau o deficienţă a carnitinei poate determina deteriorarea oxidării lanţului lung de acizi graşi, care duce la creşterea concentraţiei de acizi graşi nesaturaţi în plasmă, după masa bogată în grăsime.

După formarea acil-CoA intramitocondrială, reacţiile ulterioare ale ciclului oxidării acizilor graşi au loc în compartimentul intern. O moleculă de acil-CoA este degradată într-o secvenţă de patru reacţii: 1) oxidare prin FAD (flavin-adenindinucleotid); 2) hidratare; 3) a doua oxidare prin NAD^+; 4) tioliza prin CoA. Rezultatul acestor reacţii este scurtarea lanţului de acid gras cu doi atomi de carbon şi generarea de $FADH_2$, NADH şi acetil CoA.

Severo Ochoa şi Feodor Lynen au avut o contribuţie importantă la elucidarea acestor serii de reacţii denumite „Calea beta oxidării acizilor graşi". În prima etapă acil-tioesterul acidului gras cu CoA suferă o dehidrogenare enzimatică (sub acţiunea enzimei acil-CoA dehidrogenaza) la atomii de C alfa şi beta (C_2 şi C_3) pentru a forma produsul Δ^2, care are o configuraţie geometrică de tip trans.

Există patru acil-CoA dehidrogenaze diferite, fiecare fiind specifică unui anumit domeniu de lungime a lanţurilor de acizi graşi. Toate aceste enzime conţin FAD (flavin-adenin-dinucleotid) strâns legat la gruparea prostetică. La fel ca în dehidrogenarea succinatului în ciclul acidului citric, FAD este acceptorul de electroni, mai degrabă decât NAD^+, deoarece Δ -G a acestei reacţii este insuficientă pentru a reduce NAD^+. Electronii de la gruparea

prostetică a $FADH_2$ a acil CoA dehidrogenazei reduse sunt transferaţi la o a doua flavo-proteină numită flavo-proteină transportoare de electroni (FTE). La rândul său FTE cedează electronii unei reductaze transportoare de electroni, o proteină Fe- (ubiquinon-reductaza) care pasează potenţialul său electronic mare unui purtător al lanţului respirator, care este probabil coenzima Q. În consecinţă, în această etapă de dehidrogenare au fost formate două molecule de ATP de la $FADH_2$(asemănător oxidării succinatului la fumarat în ciclul acidului citric).

Etapa următoare este hidratarea dublei legături dintre C_2 şi C_3 de către enoil CoA hidrataza. Dubla legătură a esterului Δ^2-trans-enoil-CoA este hidratată pentru a forma 3-hidroxiacil-CoA.

$$\text{trans-}\ \Delta^2\text{-enoil CoA} + H_2O \rightleftarrows \text{L-3 hidroxiacil CoA}$$

Hidratarea dublei legături Δ^2 - trans este stereospecifică (ca şi hidratarea fumaratului şi a aconitatului). În urma hidratării rezultă formarea L-stereoizomerului 3-hidroxiacil CoA.

Hidratarea enoil CoA este preludiul unei a doua reacţii de oxidare care converteşte gruparea hidroxil de la C_3 într-o grupare ceto, cu generare de NADH.

$$\text{L-3-hidroxiacil CoA} + NAD^+ \rightleftarrows \text{3 cetoacil CoA} + NADH + H^+$$

Reacţia este catalizată de enzima 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenaza, iar acceptorul de electroni specific este NAD^+. Enzima este relativ specifică din punct de vedere al lungimii lanţului acidului gras, dar nu este absolut specifică pentru L-stereoizomer. NADH format îşi cedează electronii echivalenţi NADH dehidrogenazei din lanţul respirator mitocondrial. Aceste trei reacţii din degradarea acizilor graşi seamănă foarte mult cu ultimele etape din ciclul acidului citric.

Acil CoA → enol CoA → hidroxiacil CoA → cetoacil CoA
Succinat → fumarat → malat → oxaloacetat

În ultima etapă a ciclului de dehidrogenare a acizilor graşi, catalizată de acetil CoA acetiltransferaza, cunoscută sub numele de tiolază, 3-cetoacil-CoA suferă o scindare prin interacţiunea sa cu o a doua moleculă de CoA pentru a da fragmentul de doi atomi de carbon, carbon terminal al acidului gras sub formă de acetil-CoA. Acidul gras rămas, cu doi atomi de carbon mai scurt, apare ca tioesterul său cu CoA.

$$\underset{\text{(n carboni)}}{\text{3 cetoacil CoA} + \text{HS-CoA}} \rightleftarrows \underset{\text{(n-2 carboni)}}{\text{acetil CoA} + \text{acil CoA}}$$

Lanţul acil CoA mai scurt cu doi atomi de carbon trece printr-un alt ciclu de scindare, începând cu reacţia catalizată de acil CoA dehidrogenaza. Această reacţie de scindare, denumită şi tioliză sau scindare tiolitică, este analoagă hidrolizei. Reacţia este puternic exergonică şi de aceea favorizează scindarea. Se pare că sunt două sau trei forme ale enzimei, fiecare specifică anumitor lungimi de catenă a acizilor graşi.

Bilanţul energetic

Putem calcula energia produsă de oxidarea unui acid gras. În fiecare ciclu de reacţie o moleculă de acetil CoA şi două perechi de atomi de hidrogen au fost îndepărtate de la acil-CoA a acizilor graşi cu catenă lungă, cu formarea de $FADH_2$, NADH şi acetil-CoA. Ecuaţia globală este:

$$C_n\text{-acil CoA} + FAD + NAD^+ + H_2O + CoA \rightarrow C_{n-2}\text{-acil CoA} + FADH_2 + NADH + \text{acetil-CoA} + H^+$$

Degradarea palmitoil CoA (C16-acil CoA) solicită 7 cicluri de reacţie. În al 7-lea ciclu C4-cetoacil CoA este tiolizată în două molecule de acetil CoA. Calculul stoechiometric al oxidării palmitil CoA este:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ CoA + 7\ H_2O \rightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\ FADH2 + 7\ NADH + 7\ H^+$$

Fiecare moleculă de $FADH_2$ donează o pereche de electroni echivalenţi lanţului respirator la nivelul coenzimei Q; astfel sunt generate două molecule de ATP în timpul transportului ulterior de electroni la oxigen. În mod similar la oxidarea fiecărei molecule de NADH, de către lanţul respirator, rezultă formarea a trei molecule de ATP. Să ne amintim că oxidarea acetil-CoA în ciclul acidului citric produce 12 ATP, pe de altă parte numărul de ATP format prin oxidarea palmitoil CoA este: 14 pentru 7 molecule de $FADH_2$, 21 pentru 7 molecule NADH şi 96 pentru 8 molecule de acetil-CoA care dau un total de 131. Sunt consumate două legături fosfat înalt energetice în activarea palmitatului, în care ATP este scindat în AMP şi $2P_i$. Atunci cantitatea netă de ATP pe molecula de palmitat oxidată complet este de 129 de ATP. Eficienţa conservării de energie în oxidarea acidului gras poate fi estimată după numărul de molecule de ATP formate şi după energia liberă de oxidare a acidului palmitic la CO_2 şi H_2O determinată prin calorimetrie. Standardul energiei libere al hidrolizei a 129 de molecule ATP este -942 Kcal (129x - 7,3 Kcal). Standardul energiei libere a oxidării acidului palmitic este -2340 Kcal. Astfel, eficienţa conservării de energie în oxidarea acizilor graşi în condiţii standard este de aprox. 40% (942/2340x100 = 40%), o valoare similară cu aceea a glicolizei, ciclului acidului citric şi fosforilării oxidative.

Oxidarea acizilor graşi nesaturaţi

Acizii graşi nesaturaţi (cum ar fi palmitoleatul, un acid gras nesaturat C_{16} care are o dublă legătură între C_9 şi C_{10}) sunt oxidaţi aproape pe aceeaşi

cale generală ca şi acizii graşi saturaţi, dar în cadrul lor apar două probleme speciale. Legăturile duble ale acizilor graşi nesaturaţi naturali se află în configuraţie cis, în timp ce intermediarii Δ^2 ai acizilor graşi nesaturaţi cu CoA din oxidarea acizilor graşi saturaţi au configuraţia trans. În plus, dublele legături ale acizilor graşi nesaturaţi apar în asemenea poziţii în lanţul de carbon, încât îndepărtarea succesivă a unor fragmente de doi carboni de la capătul carboxil, dă mai degrabă o Δ^3 -acil CoA a acizilor graşi nesaturaţi decât o Δ^2 -acil CoA a acizilor graşi saturaţi care serveşte ca intermediar normal în ciclul acizilor graşi.

Palmitoleatul este activat şi transportat prin membrana mitocondrială internă în acelaşi mod cu acizii graşi saturaţi. Palmitoleoil-CoA suferă trei cicluri de degradare care sunt îndeplinite de aceleaşi enzime ca în cazul oxidării acizilor graşi saturaţi. Totuşi, cis. – Δ^3 -enoil-CoA format în etapa a treia nu este substrat pentru acil CoA dehidrogenaza. Prezenţa unei duble legături între C_3 şi C_4 previne formarea altei duble legături între C_2 şi C_3. Acest impas este rezolvat printr-o nouă reacţie care schimbă poziţia şi configuraţia dublei legături cis- Δ^3. Enoil-CoA izomeraza catalizează o trecere reversibilă a dublei legături de la configuraţia Δ^3-cis la configuraţia Δ^2-trans. Reacţiile următoare sunt aceleaşi ca în oxidarea acizilor graşi saturaţi în care trans-Δ^2-enol CoA este substratul obişnuit. A doua enzimă este necesară pentru oxidarea acizilor graşi polinesaturaţi. Acidul gras nesaturat C18 activat are o dublă legătură cisΔ^6 şi cisΔ^9 şi suferă două runde de degradare prin calea oxidării acidului gras saturat. Apoi cisΔ^2, Δ^3 enoil-CoA sunt hidratate de enoil-CoA hidrataza, aceeaşi enzimă care hidratează dubla legătură transΔ^2 din calea de oxidare a acizilor graşi saturaţi. Produsul este D-stereoizomerul unei 3-hidroxiacil-CoA şi nu L-stereoizomerul format în mod normal în timpul oxidării acizilor graşi saturaţi. Acesta nu este substrat pentru 2-3 hidroxiacil-CoA dehidrogenaza. Obstacolul este depăşit de o epimerază, 3-hidroxiacil-CoA epimeraza, care catalizează epimerizarea grupului hidroxil la C_3 pentru a da L-izomerul. Produsul acestei reacţii reversibile este apoi oxidat de 3-hidroxil-acil-CoA dehidrogenaza specifică L-izomerului şi scindat de tiolază pentru a completa ciclul de oxidare. Aceste două enzime auxiliare (enoil-CoA izomeraza şi 3-hidroxiacil-CoA epimeraza) din ciclul de oxidare a acizilor graşi fac posibilă oxidarea completă a tuturor acizilor graşi nesaturaţi obişnuiţi care se găsesc în grăsimile naturale. Numărul de molecule de ATP rezultate în urma oxidării complete a unui acid gras nesaturat este oarecum mai mic decât la acizii graşi saturaţi corespunzători, deoarece acizii graşi nesaturaţi au mai puţini atomi de hidrogen şi în consecinţă mai puţini electroni de transferat la oxigen pe calea lanţului respirator.

Acizii graşi cu un număr impar de atomi de carbon sunt puţini. Ei sunt oxidaţi în acelaşi mod ca acizii graşi cu număr par de atomi de carbon, cu excepţia faptului că produşii finali în urma tiolizei sunt acetil-CoA şi propionil-CoA în loc de două molecule de acetil-CoA. Unitatea de trei atomi de carbon activată din propionil-CoA intră în ciclul acidului citric, după ce este

convertită în succinil-CoA (propionil-CoA mai este format în oxidarea multor aminoacizi).

Corpii cetonici sunt formaţi în ficat de la acetil-CoA, dacă predomină scindarea grăsimilor. La multe vertebrate, ficatul are capacitatea enzimatică de a devia unele dintre moleculele de acetil-CoA provenite din oxidarea piruvatului sau a acizilor graşi, probabil în perioadele de formare în exces, la acetil-acetat liber şi D-beta-hidroxibutirat, care sunt transportaţi în sânge la ţesuturile periferice, unde pot fi oxidaţi pe calea ciclului acidului tricarboxilic. Aceşti compuşi, împreună cu acetona sunt denumiţi colectiv corpi cetonici. Acetil-CoA formată în oxidarea acizilor graşi intră în ciclul acidului citric numai dacă degradarea grăsimilor este echivalentă cu cea a glucidelor. Dacă predomină scindarea grăsimilor, soarta acetil-CoA este diferită. Intrarea acetil-CoA în ciclul acidului citric, depinde de disponibilitatea oxaloacetatului de a forma citrat, însă concentraţia de oxaloacetat este scăzută în cazul când glucidele sunt utilizate necorespunzător, sau nu sunt disponibile. După masă sau în diabet, oxaloacetatul este folosit pentru sinteza glucozei şi atunci nu este disponibil pentru condensarea cu acetil-CoA. În aceste condiţii, acetil-CoA este deviată spre formarea acetoacetatului şi D-beta-hidroxibutiratului. Acetoacetatul liber, care este sursa principală a celorlalţi corpi cetonici, este format din acetoacetil-CoA. O parte din acetoacetil-CoA apare din ultimii atomi de carbon ai unui acid gras cu catena lungă după îndepărtarea oxidativă a unor resturi succesive de acetil-CoA din matricea mitocondrială. Totuşi cea mai mare parte a acetoacetil-CoA formate în ficat apare din condensarea a două molecule de acetil-CoA provenite din oxidarea acizilor graşi prin acţiunea acetil-CoA acetiltransferazei.

$$\text{Acetil-CoA} + \text{acetil-CoA} \rightleftarrows \text{acetoacetil-CoA} + \text{CoA}$$

Reacţia este catalizată de o tiolază şi este reversul etapei de tioliză din oxidarea acizilor graşi. Acetoacetil-CoA formată în aceste reacţii, suferă apoi pierderea CoA, proces numit deacilare şi dă acetoacetatul liber printr-o cale metabolică specială, care se desfăşoară în matricea mitocondrială. Ea presupune formarea enzimatică şi scindarea beta-hidroxi-beta-metilglutaril-CoA un intermediar care serveşte şi ca precursor al sterolilor. Rezultatul celor două reacţii este:

$$2\ \text{acetoacetil-CoA} + H_2O \rightarrow \text{acetilacetat} + \text{CoA} + H^+$$

Acetilacetatul liber astfel produs este redus enzimatic la D-beta-hidroxibutirat dehidrogenaza NAD dependentă, care este localizată în membrana mitocondrială internă. Această enzimă este specifică pentru D-stereoizomer şi nu reduce D-beta-hidroxibutiril-CoA. 3-hidroxibutiratul este format prin reducerea acetoacetatului în matricea mitocondrială. Rata hidroxibutirat/acetoacetat depinde de raportul NADH/NAD^+ în interiorul

mitocondriei. Deoarece acetoacetatul este un beta-cetoacid el suferă o decarboxilare spontană lentă cu formarea acetonei. Mirosul de acetonă poate fi detectat în respiraţia peroanelor care au o concentraţie crescută de acetoacetat în sânge. Amestecul de acetilacetat liber şi beta-hidroxibutirat care rezultă din aceste reacţii poate difuza în afara celulelor ficatului în fluxul sanguin, pentru a fi transportat la ţesuturile periferice. În mod normal concentraţia de corpi cetonici din sânge este scăzută, dar în înfometare sau boala diabetus mellitus poate ajunge la valori foarte ridicate. Această situaţie, cunoscută sub numele de cetoză, apare atunci când viteza de formare a corpilor cetonici de către ficat depăşeşte capacitatea ţesuturilor periferice de a-i utiliza, fapt ce duce la acumularea lor în sânge.

Pentru unele ţesuturi, acetoacetatul este un combustibil major. Sediul cel mai important pentru producerea acetoacetatului şi a beta-hidroxibutiratului este ficatul. Din mitocondria hepatică substanţele difuzează în sânge şi sunt transportate la ţesuturile periferice. Până nu demult, corpii cetonici au fost priviţi ca produşi de degradare cu importanţă fiziologică mică, dar studiile lui George Cahill şi colaboratorii săi au arătat că aceşti derivaţi ai acetil-CoA sunt molecule importante pentru energia metabolismului. Acetoacetatul şi 3-hidroxibutiratul sunt combustibilul normal pentru respiraţie şi sunt surse importante de energie. Într-adevăr muşchiul inimii şi cortexul renal folosesc de preferinţă acetoacetatul în locul glucozei. Spre deosebire de aceste organe pentru creier şi hematiile persoanelor cu o dietă echilibrată, combustibilul preferat este glucoza. Totuşi creierul s-a adaptat la utilizarea acetoacetatului în timpul diabetului sau a perioadei de înfometare prelungită. În starea de inaniţie 75% din „combustibilul" folosit de creier este furnizat de acetoacetat. Acetoacetatul poate fi activat prin transferul CoA de la succinil-CoA printr-o reacţie catalizată de o CoA-transferază specifică. Acetoacetil-CoA este apoi clivată de o tiolază pentru a da două molecule de acetil-CoA, care pot intra în ciclul acidului citric. Ficatul furnizează acetoacetatul altor organe, deoarece îi lipseşte această CoA transferază specială.

Acetoacetatul poate fi privit ca forma de transport solubilă în apă a grupărilor acetil. Acizii graşi sunt eliberaţi din ţesutul adipos şi convertiţi în unităţi acetil în ficat, transportate apoi sub formă de acetoacetat. Acetoacetatul are de asemenea un rol reglator. Concentraţia mare de acetoacetat în sânge indică o abundenţă de grupări acetil şi duce la o descreştere a lipolizei în ţesutul adipos.

Animalele nu pot să convertească acizii graşi în glucoză. În special acetil-CoA nu poate fi convertită în piruvat sau acetoacetat. Doi atomi de carbon ai grupului acetil din acetil-CoA intră în ciclul acidului citric, dar doi atomi de C părăsesc ciclul, prin decarboxilările catalizate de izocitrat dehidrogenaza şi alfa-cetoglutarat dehidrogenaza. În consecinţă, oxaloacetatul este regenerat în ciclul acidului citric, dar nu se formează din nou. Spre deosebire de animale, plantele au două enzime adiţionale care le dau posibilitatea să convertească atomii de C ai acetil-CoA în oxaloacetat.

Biosinteza acizilor graşi

Sinteza acizilor graşi nu este numai reversul căii de degradare ci constă dintr-un set de reacţii, care arată că sinteza şi degradarea se produce în sistemele biologice pe căi distincte. Unele caracteristici importante ale căii pentru biosinteza acizilor graşi sunt:

a) Spre deosebire de degradarea acizilor graşi care se produce în matricea mitocondrială, sinteza lor are loc în citozol.

b) Intermediarii din sinteza de acizi graşi sunt legaţi covalent de grupările sulfhidril ale unei proteine transportoare de grupări acil (PTA), în timp ce intermediarii proveniţi din scindarea acizilor graşi sunt legaţi la coenzima A.

c) Enzimele care iau parte la sinteza acizilor graşi în organismele superioare sunt asociate cu un singur lanţ polipeptidic. Spre deosebire de acestea, enzimele de degradare a acizilor graşi nu sunt asociate.

d) Elongarea lanţului de acid gras este făcută prin adaosul unităţilor de doi-carboni, derivate de la acetil-CoA. Donorul activat al unităţilor de doi-carboni în etapa de elongare este malonil-PTA. Reacţia de elongare este îndeplinită prin eliberarea de CO_2.

e) În sinteza de acizi graşi, agentul reducător este NADPH.

f) Elongarea lanţului prin complexul acid gras-sintază încetează după formarea palmitatului (C_{18}). Elongarea mai departe şi inserţia dublelor legături sunt îndeplinite de alte sisteme enzimatice.

Etapa iniţială în sinteza acidului gras este formarea malonil-coenzima A, prin carboxilarea acetil-CoA. Reacţia este ireversibilă. Sinteza de malonil CoA este catalizată de acetil-CoA carboxilaza, care conţine ca grupare prostetică biotina. Procesul carboxilării (care are o importanţă crucială în înţelegerea procesului de sinteză a acizilor graşi) a fost descoperit de Salih Wakil şi colaboratorii săi.

Gruparea carboxil din biotină este ataşată covalent la gruparea epsilon-amină a reziduului, lizină, asemănător ca la piruvat carboxilază. Altă asemănare între acetil-CoA carboxilaza şi piruvat carboxilaza este aceea că acetil-CoA este carboxilată în două stadii: în primul stadiu se formează o carboxibiotină intermediară cu consumul unei molecule de ATP. Gruparea CO_2 activată din acest intermediar este transportată la acetil-CoA pentru a forma malonil-CoA.

$$\text{Biotin-enzima} + \text{ATP} + HCO_3^- \rightleftarrows CO_2 - \text{biotin-enzima} + \text{ADP} + P_i$$

$$CO_2 + \text{biotin-enzima} + \text{acetil-CoA} \rightarrow \text{malonil-CoA} + \text{biotin-enzima}$$

Acetil-CoA carboxilaza (enzima care catalizează această reacţie) este un exemplu de mecanism de reacţie „ping-pong", în care unul sau mai mulţi produşi de reacţie sunt eliberaţi înainte ca toate substratele să fie legate. Acetil-CoA carboxilaza de la E. Coli a fost separată în subunităţi care catalizează parţial reacţiile. La eucariote acetil-CoA carboxilaza există ca un protomer inactiv enzimatic, nu ca un polimer filamentos activ.

Interconversia este reglată alosteric, deoarece acetil-CoA carboxilaza catalizează etapa iniţială din sinteza acizilor graşi. Activatorul alosteric este citratul, care schimbă echilibrul enzimei la forma filamentoasă activă, care este forma de activitate optimă. În contrast, palmitil-CoA schimbă echilibrul la forma de protomer inactiv. Deci palmitil-CoA, produsul final, inhibă etapa iniţială a sintezei de acizi graşi.

Ciclul de alungire a lanţului în sinteza de acizi graşi

Sistemul enzimatic care catalizează sinteza unui lanţ lung de acid gras saturat, de la CoA, malonil-CoA şi NADPH se numeşte sinteza acidului gras. Reacţiile care conduc la sinteza acidului gras în organismele superioare sunt foarte asemănătoare cu cele ale bacteriilor. Faza de alungire în sinteza de acid gras începe cu formarea de acetil-PTA şi malonil-PTA. Reacţiile sunt catalizate de enzimele acetil transacilaza şi malonil transacilaza.

$$\text{Acetil-CoA + PTA} \rightleftarrows \text{acetil-PTA + CoA}$$

$$\text{Malonil-CoA + ACP} \rightleftarrows \text{malonil-PTA + CoA}$$

Malonil transacilaza are o specificitate foarte mare, în timp ce acetil transacilaza poate transfera şi alte grupe acil decât de la unităţile acetil, dar cu o rată mult mai mică. Acizii graşi cu număr impar de atomi de carbon sunt sintetizaţi pornind de la propionil-PTA, care este format de la propionil-CoA. Reacţia este catalizată de acetil transacilază.

Acetil-PTA şi malonil-PTA reacţionează pentru a forma acetoacetil-PTA. Această reacţie de condensare este catalizată de enzima de condensare acil-malonil-PTA.

$$\text{Acetil-PTA + malonil-PTA} \rightarrow \text{acetoacetil-PTA + PTA + } CO_2$$

Prin reacţia de condensare se formează o unitate de patru atomi de carbon de la o unitate de doi atomi de carbon şi una de trei atomi de carbon, cu eliberarea de CO_2. Nu se porneşte de la două unităţi de acetil-PTA cu câte doi atomi de C, pentru că echilibrul de sinteză nu este favorabil. În contrast, echilibrul este favorabil dacă reactantul este malonil-PTA, deoarece decarboxilarea sa contribuie la descreşterea substanţială a energiei libere.

Reacţia de condensare este condusă de ATP deşi aceasta nu participă direct. Moleculele de ATP sunt folosite pentru a carboxila acetil-CoA la malonil-CoA. Energia stocată în malonil-CoA este eliberată în cursul decarboxilării ce însoţeşte formarea de acetoacetil-PTA. Deşi HCO_3^- este solicitat pentru sinteza de acid gras, atomul său de carbon nu apare în produs; toţi atomii de carbon ai acidului gras sunt derivaţi de la acetil-CoA. În următoarele trei etape din sinteza acizilor graşi este redusă gruparea ceto de la C_3 la o grupare metilen. În prima etapă acetoacetil -PTA este redusă la D-3-hidroxibutiril-PTA. Această reacţie diferă de reacţia corespunzătoare a

degradării acizilor graşi în două privinţe: 1) se formează un D-epimer şi nu un L-epimer şi 2) NADPH este agentul reducător, pe când în beta-oxidare NAD^+ este agentul oxidant. Această diferenţă exemplifică principiul general că NADPH este consumat în reacţiile de biosinteză, pe când NADH este generat în reacţiile care produc energie. În etapa următoare, D-3-hidroxibutiril-PTA este dehidratat pentru a forma crotonil-PTA care este un trans-Δ^2-enoil-PTA. În etapa finală a ciclului, crotonil-PTA este redus la butiril-PTA. NADPH este din nou agentul reducător, în timp ce în reacţia corespunzătoare din beta-oxidare agentul oxidant este FAD. În aceste ultime trei etape – o reducere, o dehidratare şi a doua reducere – acetoacetil-PTA este convertit în butiril-PTA care efectuează primul ciclu de alungire. În a doua rundă a sintezei de (acid gras), butiril-PTA condensează cu malonil-PTA pentru a forma un C_6-beta-cetoacil-PTA. Această reacţie este asemănătoare cu cea din prima rundă în care acetil-PTA condensează cu malonil-PTA pentru a forma un C_4-beta-cetoacil-PTA. Prin reacţiile de reducere, dehidratare şi o a doua reducere, C_6-beta-cetoacil-PTA este convertit în C_6-acil-PTA, care este gata pentru a treia rundă de alungire. Ciclurile de alungire a lanţului continuă până ce este format C_{16}-acil-PTA. Acest intermediar nu este substrat pentru enzima de condensare şi este hidrolizat pentru a da palmitat şi PTA.

Bilanţul stoechiometric al sintezei de acid gras

Acetil-CoA + 7 malonil-CoA + 14 NADPH + 7 H^+ → palmitat + 7 CO_2 + 14 $NADP^+$ + 8 CoA + 6 H_2O

Ecuaţia pentru sinteza de malonil-CoA folosit în reacţia de mai sus este:

7 acetil-CoA + 7 CO_2 + 7 ATP → 7 malonil-CoA + 7 ADP + 7 P_i + 7 H^+

De aici, calculul stoechiometric total pentru sinteza palmitatului este:

8 acetil-CoA + 7 ATP + 14 NADPH → palmitat + 14 $NADP^+$ + 8 CoA + 6 H_2O + 7 ADP + 7 Pi

La eucariote, acizii graşi sunt sintetizaţi de un complex enzimatic multifuncţional. La mamifere, sintaza acidului gras este un dimer de subunităţi identice. Fiecare lanţ este pliat în trei domenii unite prin regiuni flexibile. Domeniul 1, unitatea de intrare şi condensare a substratului conţine acetil transferaza, malonil transferaza şi beta-cetoacil sintaza (enzima de condensare). Domeniul 2, unitatea de reducere conţine proteina transportoare de acil (PTA), beta-ketoacil reductaza, dehidrataza şi enoil reductaza. Domeniul 3, unitatea de eliberare a palmitatului conţine tioesteraza.

Complexele multienzimatice la multe eucariote sunt proteine multifuncţionale, în care enzime diferite sunt legate covalent într-un singur

lanţ polipeptidic. Un avantaj al acestui aranjament este acela că sinteza enzimelor diferite este coordonată. Mai mult, un complex multienzimatic care constă din enzime unite covalent este mai stabil decât unul format prin atracţii noncovalente. Probabil că enzimele multifuncţionale ca cele din sinteza acizilor graşi apar în cursul evoluţiei prin „jocul" exonilor.

Sinteza palmitatului solicită intrarea a 8 molecule de acetil-CoA, 14 NADPH şi 7 ATP. Acizii graşi sunt sintetizaţi în citozol, în timp ce acetil-CoA este formată din piruvat în mitocondrie. Deci, acetil-CoA trebuie să fie transferată din mitocondrie în citozol. Mitocondria nu are permeabilitate mare pentru acetil-CoA. Carnitina transportă numai acizii graşi cu lanţ lung. Bariera pentru acetil-CoA este trecută cu ajutorul citratului care transportă grupările acetil prin membrana mitocondrială internă. Citratul este format în matricea mitocondrială prin condensarea acetil-CoA cu oxaloacetat (figura 58).

Când citratul este prezent în concentraţie mare, este transportat în citozol, unde este scindat de enzima citrat liaza.

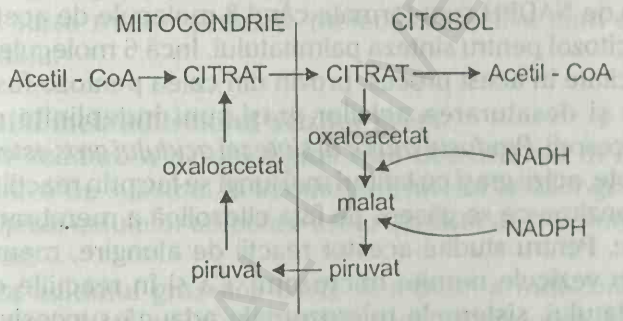


Fig. 58. Transferul acetil CoA de la mitocondrie la citozol. NADH este convertit printr-o serie de reacţii la NADPH.

$$\text{Citrat} + \text{ATP} + \text{CoA} + H_2O \text{ — acetil-CoA} + \text{ADP} + P_i + \text{oxaloacetat}$$

Acetil-CoA şi oxaloacetatul sunt transferate din mitocondrie în citozol cu consumul unei molecule de ATP.

Sursele de NADPH pentru sinteza acizilor graşi

Oxaloacetatul format în transferul grupelor de acetil în citozol trebuie să se reîntoarcă în mitocondrie. Membrana mitocondrială internă este nepenetrabilă pentru oxaloacetat, deci sunt necesare o serie de reacţii de navetă. Mai important este faptul că aceste reacţii generează o mare parte din moleculele de NADPH necesare pentru sinteza de acid gras. În primul rând, oxaloacetatul este redus la malat de NADH. Reacţia este catalizată de malat dehidrogenază în citozol.

$$\text{Oxaloacetat} + \text{NADH} + H^+ \rightleftarrows \text{malat} + NAD^+$$

Apoi, malatul este decarboxilat oxidativ de o enzimă malat legată de NADP+ (aşa-numita enzimă malică).

$$\text{Malat} + NADP^+ \rightarrow \text{piruvat} + CO_2 + NADPH$$

Piruvatul format în această reacţie difuzează cu uşurinţă în mitocondrie, unde este carboxilat la oxaloacetat de enzima piruvat carboxilaza.

$$\text{Piruvat} + CO_2 + ATP + H_2O \rightarrow \text{oxaloacetat} + ADP + P_i + 2H^+$$

Suma celor trei reacţii este:

$$NADP^+ + NADH + ATP + H_2O \rightarrow NADPH + NAD^+ + ADP + P_i + H^+$$

Deci: o moleculă de NADPH este generată pentru fiecare moleculă de acetil-CoA, care este transferată de la mitocondrie la citozol. De aici rezultă că 8 molecule de NADPH sunt formate când 8 molecule de acetil-CoA sunt transferate la citozol pentru sinteza palmitatului. Încă 6 molecule de NADPH care sunt solicitate în acest proces, provin din calea pentozo-fosfatului.

Alungirea şi desaturarea acizilor graşi sunt îndeplinite de sisteme enzimatice accesorii. *Produsul major al sintezei acidului gras este palmitatul.*

La eucariote, acizii graşi cu lanţuri mai lungi se fac prin reacţii de alungire catalizate de enzime ce se găsesc pe faţa citozolică a membranei reticului endoplasmatic. Pentru studiul acestor reacţii de alungire, membrana este fragmentată în vezicule numite microzomi. Ca şi în reacţiile care duc la sinteza palmitatului, sistemele microzomale adaugă succesiv câte două unităţi de carbon la capătul carboxil al acizilor graşi saturaţi sau nesaturaţi. Donorul unităţii de doi carboni pentru alungirea unui acid gras-acil CoAs este malonil CoA. Decarboxilarea moleculei de malonil CoA duce la condensarea acestor unităţi. Sistemele microzomiale introduc de asemenea dubla legătură în lanţul lung de acil CoAs. De exemplu, în conversia stearoil CoA în oleoil CoA, este inserată o dublă legătură cis- Δ^9 de către o oxidază care foloseşte oxigen molecular şi NADH (sau NADPH).

$$\text{Stearoil CoA} + NADH + H^+ + O_2 \rightarrow \text{oleoil CoA} + NAD^+ + 2H_2O$$

Această reacţie este catalizată de un complex de trei enzime legate de membrană: NADH-citocrom b_5 reductaza, citocrom b_5 şi o desaturază. Primii electroni sunt transferaţi de la NADH la nucleul FAD al NADH-citocrom b_5 reductaza. Fierul atomic din hemul citocromului b_5 este redus la forma feroasă. Ionul Fe^{3+} din enzima desaturaza este convertit la Fe^{2+} fapt care îl face capabil să interacţioneze cu O_2 şi substratul acid gras saturat acil-CoA (figura 59).

Se formează o dublă legătură şi sunt eliberate două molecule de H_2O. Doi electroni vin de la NADH şi doi de la legătura substratului acil. O varietate

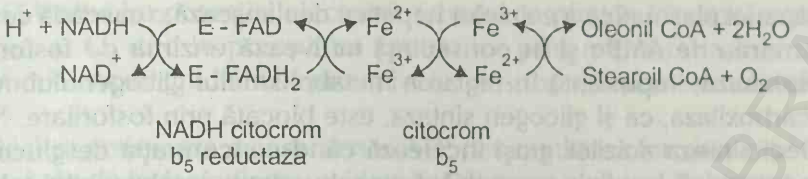


Fig. 59. Conversia steroil CoA în oleil CoA.

de acizi graşi nesaturaţi poate fi formată de la oleat printr-o combinaţie a reacţiilor de alungire şi desaturare. Mamiferelor le lipsesc enzimele care introduc dubla legătură la atomii de carbon C_9 din lanţul acidului gras, deci mamiferele nu pot sintetiza linoleat (18 : 2 cis Δ^9, Δ^{12}) şi linolenat (18 : 3 cis Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15}). Linoleatul şi linolenatul sunt doi acizi graşi esenţiali. Acizii graşi esenţiali trebuie să fie furnizaţi de dietă. Ei sunt importanţi pentru organism, fiind puncte de plecare pentru sinteza altor acizi graşi nesaturaţi.

Arahidonatul (20 : 4), acidul gras nesaturat derivat din linolenat, este la rândul său sursa multor semnale moleculare active cum este hormonul prostaglandina.

Controlul metabolismului acizilor graşi

Rata de oxidare a acidului gras este determinată în mare parte de disponibilitatea de substrat. În înfometare, nivelul acizilor graşi liberi creşte deoarece lipaza celulelor adipoase este stimulată de hormoni ca epinefrina şi glucagonul.

Intrarea acidului gras acil-CoAs în matricea mitocondrială este de asemenea reglată. Malonil-CoA care este prezentă în concentraţie mare când carburanţii sunt abundenţi, inhibă carnitin acil-transferaza I, deci acil-CoAs nu are acces cu uşurinţă la matricea mitocondrială. Mai mult, două enzime din calea beta-oxidării sunt puternic inhibate când încărcătura energetică este mare. NADH inhibă 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenaza şi acetil-CoA inhibă tiolaza. Sinteza acizilor graşi este maximă atunci când glucidele sunt abundente şi nivelul acizilor graşi este mic.

Atât mecanismele de control pe timp scurt, cât şi cele pe timp lung sunt importante. Cel mai important reglator pe timp scurt pentru sinteza de acizi graşi este concentraţia citratului în citozol. Citratul stimulează acetil-CoA carboxilaza, care catalizează formarea malonil-CoA, etapa de iniţiere a sintezei de acizi graşi. Concentraţia de citrat este mare când este abundent atât ATP, cât şi acetil-CoA. O cantitate mare de citrat indică faptul că unităţi de doi-carboni şi ATP sunt disponibile pentru sinteza de acizi graşi. Antagonistul citratului este palmitoil CoA, care este abundent când este un exces de acizi graşi. Palmitoil CoA inhibă translocaza, care transportă citratul de la mitocondrie la citozol, ca şi glucozo 6-fosfat dehidrogenaza care generează NADPH. Acetil-CoA carboxilaza este de asemenea controlată prin fosforilare reversibilă. Atunci când concentraţia de glucoză în sânge este scăzută, este eliberat glucagonul. Legarea glucagonului la receptorii

membranei plasmatice a celulelor hepatice declanşează o cascadă ce duce la formarea de AMPc şi în consecinţă activează enzima de fosforilare, proteinkinaza, importantă în reglarea metabolismului glicogenului. Acetil-CoA carboxilaza, ca şi glicogen sintaza, este blocată prin fosforilare.

Deci sinteza acizilor graşi încetează când concentraţia de glucoză în sânge este mică. Insulina, semnalul că este abundent „combustibilul celular", are un efect invers asupra acetil-CoA carboxilazei şi începe sinteza acizilor graşi.

Controlul pe termen lung este mediat prin viteza de sinteză şi degradare a enzimelor ce participă la sinteza acizilor graşi. Acest tip de reglare este cunoscut sub numele de control de adaptare.

4.4. Mecanisme de reglare a metabolismului

Urmărirea fluxului de molecule cheie: glucoza 6 - fosfat, piruvat şi acetil-CoA, care provin din întretăierea a trei căi metabolice majore (metabolismul glucidelor, grăsimilor şi proteinelor), ne ilustrează integrarea diferitelor căi metabolice din organism.

Trebuie să luăm în consideraţie, de asemenea, interdependenţa diferitelor organe şi ţesuturi (creier, muşchi, ţesut adipos şi ficat) în menţinerea unei stări metabolice corespunzătoare pentru corp ca întreg. O mare importanţă pentru reglarea metabolismului o au hormonii: insulina, glucagonul, epinefrina şi noradrenalina, dar cel mai important aspect al integrării metabolismului este controlul concentraţiei de glucoză din sânge.

Strategia de bază a metabolismului este formarea de ATP, reducerea consumului de energie şi producerea de metaboliţi necesari pentru biosinteză. Pentru organism, furnizorul universal de energie este molecula de ATP. Transferul grupării fosforil, cu potenţial energetic mare de la ATP, face posibilă utilizarea lui drept sursă de energie în contracţia musculară, transport activ sau amplificare de semnal şi biosinteză. Hidroliza unei molecule de ATP schimbă raportul echilibrului produs-reactant într-o reacţie cuplată, cu un factor de aproximativ 10^8. Pe de altă parte, o secvenţă de reacţie nefavorabilă din punct de vedere termodinamic, poate să fie făcută foarte favorabilă prin cuplarea ei cu hidroliza unui număr suficient de mare de molecule de ATP. Ex: în conversia mevalonatului în izopentil pirofosfat (o unitate cu 5 atomi de carbon activată) din sinteza colesterolului sunt consumate 3 molecule de ATP.

ATP este generat de oxidarea moleculelor de glucoză, acizi graşi şi aminoacizi. Intermediarul comun al multor oxidări este acetil-CoA. Carbonii unităţii acetil sunt oxidaţi complet la CO_2 prin ciclul acidului citric, cu formarea consecutivă de NADH şi $FADH_2$. Aceşti transportori de electroni,

transferă înaltul lor potenţial electronic lanţului respirator. Ulterior lanţul de electroni ai O_2 duc la pomparea protonilor prin membrana internă a mitocondriei. Acest gradient de protoni este folosit apoi la sinteza moleculelor de ATP.

Glicoliza generează de asemenea ATP, dar cantitatea formată este mult mai mică decât în fosforilarea oxidativă. Oxidarea glucozei la piruvat, produce numai 2 moli de ATP, în timp ce oxidarea completă a glucozei la CO_2, produce 36 (sau 38) de molecule de ATP. Totuşi glicoliza se poate produce rapid, în timp scurt, în condiţii de anaerobioză, spre deosebire de fosforilarea oxidativă care solicită o aprovizionare continuă cu O_2.

În biosintezele reductive, donorul major de electroni este molecula de NADPH. În multe biosinteze, produsul are o cantitate de energie mai mică decât precursorii şi astfel este necesară reducerea energiei, deci a moleculei de ATP. Potenţialul energetic mare solicitat de aceste reacţii este furnizat de obicei de NADPH. De ex: în biosinteza acizilor graşi, grupul ceto al unei unităţi de 2 carboni adăugată, este redus la un grup metilen prin intrarea a 4 electroni de la 2 molecule de NADPH.

Activarea oxigenului de către oxigenaze în reacţiile de hidroxilare, ilustrează de asemenea rolul moleculelor de NADPH ca reductant. O mare parte din cantitatea de NADPH solicitată este furnizată de calea pentozo-fosfatului. Acest reductant mai este furnizat de reacţiile în tandem ale navetei mitocondriale citrat-piruvat şi enzime malat din citozol.

Biomoleculele sunt construite de la un set relativ mic de „blocuri de sinteză". Cele mai diverse molecule necesare vieţii sunt sintetizate de la un număr foarte mic de precursori. Căile metabolice care generează ATP şi NADPH, furnizează material pentru sinteza unui număr mare de molecule necesare vieţii. De ex: dihidroxiacetonfosfatul, format în glicoliză, dă naştere la glicerol, care este baza trigliceridelor. Fosfoenolpiruvatul, alt intermediar glicolitic, furnizează o parte din scheletul carbonic al aminoacizilor aromatici. Acetil-CoA, un intermediar comun în multe căi metabolice, furnizează unităţi de 2-C într-o mare varietate de căi de biosinteză. Succinil-CoA format în ciclul acidului citric este un precursor al porfirinelor. Riboza-5-fosfatul care este format în calea pentozo-fosfatului (ca şi NADPH) este sursa de unităţi glucidice a nucleotidelor. Biosinteza multor compuşi solicită substanţe cu 1 C. O sursă a acestor elemente este tetrahidrofosfatul. Donorul principal al grupei metil este S-adenozilmetionina, care este strâns legată de metabolismul aminoacizilor. Deci căile metabolice centrale au un rol atât anabolic, cât şi catabolic.

Căile de biosinteză şi cele catabolice sunt aproape întotdeauna distincte. De ex: calea pentru sinteza acizilor graşi este diferită de cea a degradării lor. De asemenea glicogenul este sintetizat şi degradat în seturi de reacţie diferite. Această separare face posibil ca atât biosinteza, cât şi degradarea să fie întotdeauna avantajoase din punct de vedere termodinamic.

O cale de biosinteză este făcută exergonică prin cuplarea ei cu hidroliza unui număr suficient de mare de molecule de ATP. De ex: sunt consumate

mai multe legături fosfat înalt energetice (~ P) în convertirea piruvatului în glucoză în timpul procesului de gluconeogeneză, decât sunt câştigate prin convertirea glucozei în piruvat în cursul glicolizei. În plus, atât gluconeogeneza, cât şi glicoliza sunt reacţii înalt exergonice în condiţii celulare. Punctul esenţial este faptul că vitezele căilor metabolice sunt coordonate mai mult de activitatea enzimelor cheie, decât de multitudinea reacţiilor. Separarea căilor metabolice – biosinteza şi degradarea metaboliţilor – contribuie mult la eficienţa controlului metabolic.

Cele patru feluri de molecule folosite ca metaboliţi majori sunt: glucidele, acizii graşi, corpii cetonici şi aminoacizii. Valoarea calorică a arderilor metabolice este exprimată în kilocalorii (Kcal) pe gram. Aproximarea valorii calorice a metaboliţilor majori este redată în tabelul nr. 16.

Tabelul 16

Valoarea izocalorică a metaboliţilor majori

Metaboliţi majori	Valoare calorică (Kcal/g)
Glucide (glucoza, glicogen etc.)	4
Aminoacizi (medie)	4
Corpi cetonici (hidrobutirat, acetoacetat)	4
Acizi graşi	9

Soarta metaboliţilor în organism

a. Glucoza circulantă în organism este un carburant major şi de aceea un mare număr de mecanisme sunt folosite pentru a menţine o concentraţie adecvată de glucoză în sânge.

b. Glucidele sunt stocate în primul rând ca glicogen în ficat şi muşchiul scheletic şi mai puţin în alte ţesuturi. Creierul stochează foarte puţin glicogen.

c. Numai acele celule ce conţin glucoză 6-fosfat (de ex: ficat, rinichi şi intestinul subţire) pot folosi glicogenul pentru a menţine concentraţia de glucoză din sânge constantă.

d. Trigliceridele formează o sursă potenţială de glucoză; în special glicerolul provenit din hidroliza triglicerolului poate fi convertit în glucoză de către ţesuturile gluco-neogenice. Trigliceridele sunt de asemenea surse de acizi graşi.

e. Catabolismul aminoacizilor glucogenici poate furniza glucoză; 100 gr. proteine produce 60 gr. glucoză. Proteinele pot fi considerate şi ca sursă de acizi graşi.

În considerarea metabolismului trebuie luate în discuţie şi ciclurile de hrănire-înfometare. Omul se hrăneşte intermitent. Deşi perioada de timp

dintre mese poate fi scurtă în timpul zilei, în timpul nopţii poate fi o perioadă de 6-8 ore fără hrană. Pentru a uşura discuţiile integrării metabolismului şi folosirea arderilor metabolice este util să definim diferitele stări ale ciclului saţietate-înfometare şi starea de post prelungit.

a. Starea de saţietate (post prandială), imediat după masă, în care nivelul substanţelor energetice din plasmă este foarte ridicat.

b. Starea de înfometare (după absorbţia alimentelor) se produce la mai multe ore după masă.

c. Inaniţia se produce după două sau trei zile fără hrană.

În timpul hrănirii şi puţin timp după aceea arderile metabolice din ţesuturi pot proveni direct din ingerarea, digestia şi absorbţia hranei. În perioada de înfometare, combustibilul metabolic folosit de ţesuturi derivă din metabolizarea stocului de substanţe energetice.

Reglarea metabolică

Reacţiile complexe din celule sunt coordonate şi reglate prin mai multe căi: 1. interacţiuni alosterice; 2. control respirator; 3. modificări covalente; 4. concentraţia de enzime: 5. compartimentarea celulară; 6. specializarea metabolică a organelor; 7. reglarea hormonală.

Tabelul 17

Reglarea nehormonală a majorităţii căilor metabolice

Calea	Modul de reglare	Enzima cheie	Compuşi care	
			stimulează	inhibă
Ciclul acidului citric	control respirator	-	-	-
Oxidarea acizilor graşi	control respirator	-	-	-
Sinteza acizilor graşi	control alosteric	Acetil CoA carboxilaza	citrat	palmitoil-CoA
Gluconeogeneza	control alosteric	$F_{1,6}BP$	citrat	$F_{2,6}BP$; AMP
Glicogeneza	cascada de reacţii	glicogen sintaza	-	-
Glicogenoliza	cascada de reacţii	glicogen fosforilaza	-	-
Glicoliza	control alosteric	fosfofructo-kinaza	$-F_{2,6}BP$, AMP	citrat, ATP
Calea pentozo-fosfatului	disponibilitatea de substrat	glucoza 6-fosfat dehidroge naza	$NADP^+$	-

1. **Interacţiuni alosterice.** Fluxul moleculelor în multe căi metabolice este determinat în primul rând de concentraţia şi activitatea unor enzime mai degrabă decât de cantitatea de substrat disponibil. Reacţiile ireversibile sunt posibile centre de control. Prima reacţie ireversibilă dintr-o cale metabolică (etapa de angajare) este de obicei un element de control important. Enzimele care catalizează etapa de iniţiere sunt reglate alosteric. Căile metabolice reglate în felul acesta sunt: glicoliza, gluconeogeneza şi sinteza acizilor graşi.

a) *Glicoliza*. Centrul reglării: fosfofructokinaza care este activată de fructoza 2-6 bifosfat ($F_{2,6}BP$) şi de adenozinmonofosfat (AMP) şi este inhibată de citrat şi adenozintrifosfat (ATP).

b) *Gluconeogeneza*. Centrul reglării este: fructoza 1,6 bifosfatul. Activatori: citratul şi adenozintrifosfatul (ATP). Inhibitori: $F_{2,6}BP$ şi AMP.

c) *Sinteza acizilor graşi*. Centrul reglării este acetil coenzima A carboxilaza (CoA). Activator: citratul. Inhibitor: palmitoil CoA.

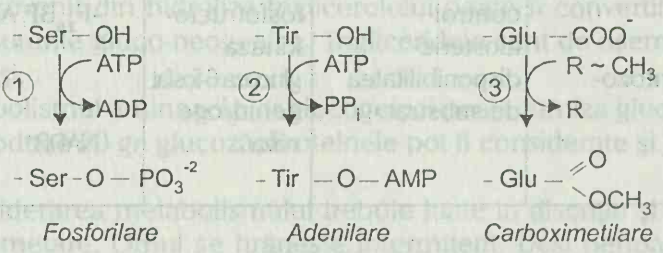
Ulterior, reacţiile ireversibile dintr-o cale metabolică pot fi de asemenea controlate. Interacţiunile alosterice permit enzimelor să detecteze diverse semnale şi să integreze informaţia.

2. **Control respirator.** Sub control metabolic este reglat fluxul de metaboliţi prin care o cale metabolică este în concordanţă cu nevoia de ATP a celulei. În acest fel sunt reglate următoarele căi metabolice: ciclul acidului citric, sinteza acizilor graşi şi fosforilarea oxidativă.

3. **Modificări covalente.** Unele enzime reglatoare sunt controlate pe lângă interacţiunile alosterice şi de modificări covalente. De ex: activitatea catalitică a glicogen-fosforilazei este mărită prin fosforilare, în timp ce aceea a glicogen sintazei este diminuată. Aceste modificări covalente sunt catalizate de enzime specifice.

Alt exemplu este glutamin sintetaza a cărei activitate este scăzută de inserţia covalentă a unei molecule de AMP. Adăugarea şi îndepărtarea acestei grupări care modifică activitatea glutamin sintetazei este catalizată de asemenea de o enzimă specifică. Modificările covalente sunt folosite pe lângă controlul alosteric noncovalent, deoarece modificările covalente ale enzimelor cheie din căile metabolice reprezintă stadiul final al cascadei de amplificare.

În consecinţă, căile metabolice pot fi schimbate cu uşurinţă de semnale foarte mici cum este acţiunea epinefrinei în stimularea scindării glicogenului. Exemple de modificări covalente reversibile ale proteinelor: fosforilare (1), adenilare (2), carboximetilare (3).



4. **Concentraţia de enzime** şi activitatea lor este controlată. Viteza de sinteză şi degradare a unor enzime reglatoare este controlată hormonal. De asemenea fluxul metabolic este determinat şi de disponibilitatea de substrat în calea pentozofosfatului şi în ciclul ureei. Unii hormoni reglează direct sau indirect fluxul de metaboliţi prin unele căi metabolice.

Reglarea hormonală a arderilor metabolice. Hormonii joacă un rol cheie în reglarea metabolismului. În special insulina, glucagonul, epinefrina şi norepinefrina au efecte mari asupra stocajului şi mobilizării metaboliţilor.

a) *Insulina.* Acest hormon proteic de 5, 8 Kd este un reglator important al metabolismului glucidic. Insulina este secretată de celule β ale pancreasului, secreţia fiind stimulată de glucoză şi de sistemul nervos parasimpatic. În esenţă, insulina semnalează starea de hrănire şi stimulează stocarea combustibilului metabolic şi sinteza de proteine prin diferite căi. Insulina iniţiază defosforilarea enzimelor cheie. O consecinţă este stimularea sintezei de glicogen în muşchi şi ficat şi inhibarea gluconeogenezei în ficat. De asemenea, insulina accelerează glicoliza în ficat, care duce la creşterea sintezei de acizi graşi. Intrarea glucozei în muşchi şi celulele adipoase este favorizată de insulină. Abundenţa de acizi graşi şi glucoză în ţesutul adipos duce la sinteza şi stocarea triacilglicerolului. Acţiunea insulinei se extinde şi asupra metabolismului aminoacizilor şi proteinelor. Ea favorizează preluarea aminoacizilor ramificaţi (valina, leucina şi izoleucina) de către muşchi, fapt ce duce la sinteza proteinelor musculare. Insulina are în general un efect stimulator aupra sintezei proteice şi inhibă degradarea intracelulară a proteinelor:

b) *Glucagonul* este un hormon polipeptidic de 3, 5 Kd secretat de celulele α ale pancreasului, ca răspuns al nivelului scăzut de glucoză în starea de înfometare. Organul ţintă principal pentru glucagon este ficatul. Glucagonul stimulează scindarea glicogenului şi inhibă sinteza de glicogen prin declanşarea cascadei mediată de AMPc ce duce la fosforilarea enzimelor fosforilaza şi glicogen sintaza. De asemenea glucagonul inhibă sinteza de acizi graşi, prin diminuarea producerii de piruvat şi scăderea activităţii acetil CoA carboxilazei. În plus, glucagonul stimulează gluconeogeneza şi blochează glicoliza prin scăderea nivelului de $F_{2,6}BP$. Toate acţiunile cunoscute ale glucagonului sunt mediate de proteinkinaze, care sunt activate de AMPc. Rezultatul acestor acţiuni este creşterea eliberării glucozei de către ficat. Glucagonul stimulează de asemenea creşterea nivelului de AMPc în celulele adipoase, fapt ce are ca rezultat activarea unei lipaze care mobilizează triglicerolul.

c) *Epinefrina şi norepinefrina.* Aceşti hormoni, catecolamine, sunt secretate de medulosuprarenală şi de terminaţiile nervoase ale nervilor simpatici, ca răspuns la nivelul căzut de glucoză în sânge. Ca şi glucagonul, catecolaminele stimulează mobilizarea glicogenului şi triacilglicerolului prin declanşarea cascadei mediate de AMPc. Ele diferă de glucagon prin aceea că efectul glicogenolitic al lor este mai mare în muşchi decât în ficat. Altă

acţiune a catecolaminelor este aceea că inhibă preluarea glucozei de către muşchi; în schimb sunt folosiţi pentru arderile metabolice acizii graşi eliberaţi de ţesutul adipos. De asemenea, epinefrina stimulează secreţia de glucagon şi inhibă secreţia de insulină. În concluzie, catecolaminele cresc cantitatea de glucoză eliberată de ficat în sânge şi descresc utilizarea glucozei de către muşchi.

Insulina semnalează starea de saturare şi disponibilitatea glucozei în sânge prin următoarele acţiuni: stimulează sinteza glicogenului, grăsimilor şi proteinelor; inhibă degradarea glicogenului, grăsimilor şi proteinelor.

Glucagonul şi epinefrina semnalează starea de inaniţie în care concentraţia de glucoză în sânge este scăzută prin următoarele acţiuni: inhibă sinteza glicogenului, grăsimilor şi proteinelor; stimulează degradarea glicogenului şi acizilor graşi şi proteinelor.

Epinefrina semnalează starea de *stress* când este solicitată mobilizarea depozitului.

Unii metaboliţi pot fi folosiţi ca intermediari în diferite procese. Controlul direcţiei fluxului acestor intermediari este un factor primar în integrarea metabolismului la nivel celular.

Glucozo 6-fosfatul poate fi convertit în: glucoză, în ţesuturile gliconeogenice; glucozo 1-fosfat şi folosit în sinteza glicogenului; piruvat (via glicoliză); ribozo 5-fosfat sau substrat pentru sinteza nucleotidelor.

Piruvatul poate fi convertit în: oxaloacetat şi metabolizat via acidului citric; acetil CoA (de enzima piruvat hidrogenaza); alanina (via transaminare); lactat (în muşchi).

Acetil CoA poate suferi următoarele transformări: poate fi oxidată la CO_2, via ciclul acidului citric; poate fi folosită în sinteza acizilor graşi; poate fi convertită la 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) care este precursor al colesterolului şi al corpilor cetonici.

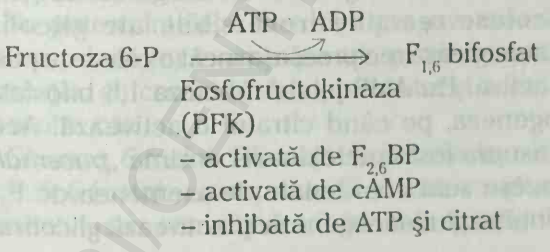
5. **Compartimentarea celulară.** Căile metabolice ale organismelor eucariote sunt puternic influenţate de prezenţa compartimentelor celulare. Glicoliza, calea pentozofosfatului şi sinteza acizilor graşi au loc în citozol, în timp ce oxidarea acizilor graşi, ciclul acidului citric, fosforilarea oxidativă şi formarea corpilor cetonici sunt efectuate în mitocondrie. Unele procese, ca gluconeogeneza şi sinteza de uree, depind de localizarea reactanţilor în citozol sau mitocondrie şi astfel pătrunderea lor prin membrana mitocondrială internă este adesea reglată. De ex: acizii graşi transportaţi în mitocondrie sunt degradaţi rapid, spre deosebire de acizii graşi din citozol, care sunt esterificaţi şi exportaţi. Lanţurile lungi ale acizilor graşi sunt transportate în matricea mitocondrială ca esteri ai carnitinei, un transportor care face posibilă traversarea membranei mitocondriale interne de către aceste molecule.

6. **Specializarea metabolică a organelor.** Reglarea metabolismului la eucariotele superioare este puternic influenţată şi mărită de existenţa organelor cu roluri metabolice diferite. Prezentăm în continuare *principalele căi metabolice şi centrele de control importante*.

a) *Glicoliza* este o secvenţă de reacţii care se produc în citozol, în care se converteşte o moleculă de glucoză în două molecule de piruvat, cu generarea concomitentă a 2 molecule de ATP şi 2 de NADH. Molecula de NAD^+ consumată în reacţia catalizată de gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenază trebuie să fie regenerată pentru ca glicoliza să continue. În condiţii de anaerobioză (ca în muşchiul scheletic foarte activ) acest lucru este îndeplinit prin reducerea piruvatului la lactat. Alternativ, în condiţii de aerobioză, NAD^+ este regenerat de transferul de electroni de la NADH la O_2 prin lanţul de transport de electroni.

Glicoliza are două scopuri importante: degradează glucoza pentru a genera ATP şi furnizează scheletul carbonic pentru biosinteze. Cele două necesităţi importante ale organismului reglează rata conversiei glucozei în piruvat.

Cel mai important punct de control este fosfofructokinaza, enzima care catalizează etapa de angajare în glicoliză. O concentraţie mare de ATP inhibă fosfofructokinaza. Acest efect inhibitor este mărit de citrat şi redus de AMP. Deci, rata glicolizei depinde de nevoia de ATP (semnalul dat de raportul ATP/AMP) şi de nevoia de „unităţi de sinteză" (semnalul dat de concentraţia de citrat). În ficat, cel mai important reglator al fosfofructokinazei este fructoza 2,6-bifosfatul ($F_{2,6}BP$). Concentraţia de $F_{2,6}BP$ este determinată de activitatea kinazei care formează gruparea 2-fosfat, de la F_6P. Când glucoza din sânge este scăzută, se declanşează cascada glucagon care duce la activarea fosfofructokinazei (PFK) din ficat. Rezultatul este creşterea afluxului de metaboliţi prin glicoliză şi astfel este furnizat mai mult piruvat pentru generarea de ATP în mitocondrie. Fructoza 2,6-bifosfatul care se formează din F6P când acesta este în cantitate mare, activează PFK numai în celulele hepatice.



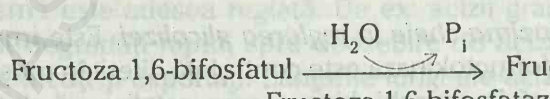
Fosfofructokinaza este enzima cheie în reglarea glicolizei. Este important de remarcat faptul că fosfofructokinaza este controlată diferit în muşchi.

Studii recente au arătat că în muşchi, kinaza care catalizează sinteza de $F_{2,6}BP$ este stimulată de AMPc şi este indusă fosforilarea. Atunci, epinefrina stimulează glicoliza musculară, dar o inhibă în ficat datorită diferenţei dintre izoenzime. Glicogenoliza hepatică indusă de epinefrină serveşte la furnizarea glucozei în muşchi, care prin glicoliza rapidă generează ATP necesar activităţii contractile.

b) *Ciclul acidului citric.* Această cale comună de oxidare a moleculelor de glucide, aminoacizi şi acizi graşi are loc în mitocondrie. Mulţi metaboliţi intră în ciclu sub formă de acetil CoA. Oxidarea completă a unei molecule de acetil generează o moleculă de ATP, trei molecule NADH şi o moleculă de $FADH_2$. Patru perechi de electroni sunt transferaţi la O_2 prin lanţul de transport de electroni; se formează astfel un gradient de protoni, care duce la sinteza a unsprezece molecule de ATP. Moleculele de NADH şi $FADH_2$ sunt oxidate, numai dacă ADP este fosforilat simultan la ATP. Acest cuplaj denumit control respirator pune în concordanţă rata ciclului acidului citric cu nevoia de ATP. Un surplus de ATP diminuează activitatea a trei enzime din ciclu: citrat sintaza, izocitrat dehidrogenaza şi α-cetoglutarat dehidrogenaza. Ciclul acidului citric are şi un rol anabolic: furnizează intermediari pentru sinteza de succinil-CoA sau pentru sinteza profirinelor.

c) *Calea pentozo-fosfatului.* Seria de reacţii care are loc în citozol are două scopuri: generarea de NADH pentru biosintezele reductive şi formarea de ribozo 5-fosfat pentru sinteza de nucleotide. Prin conversia glucozo 6-fosfatului în riboza 5-fosfat sunt generate două molecule de NADPH. Etapa iniţială a acestei căi este dehidrogenarea glucozo 6-fosfatului, reacţie controlată de concentraţia de $NADP^+$, acceptor de electroni. Grupul fosforil din structura NADPH este o marcă distinctă faţă de NADH. Această diferenţiere face posibil ca în acelaşi compartiment celular să fie un raport mare atât de $NADPH/NADP^+$, cât şi de $NAD^+/NADH$. În consecinţă, biosinteza şi glicoliza se pot produce simultan cu viteză mare.

d) *Gluconeogeneza.* Glucoza poate fi sintetizată în ficat şi rinichi de la precursori neglucidici cum sunt: lactatul, glicerolul şi aminoacizii. Punctul de intrare în această cale este piruvatul, care este carboxilat la oxaloacetat în mitocondrie. Oxaloacetatul este apoi decarboxilat şi fosforilat în citozol pentru a forma fosfoenolpiruvatul. Alte reacţii distincte ale gluconeogenezei sunt două etape care ocolesc reacţiile ireversibile ale glicolizei. Gluconeogeneza şi glicoliza se reglează reciproc, aşa încât o cale este pasivă, în timp ce alta este foarte activă. Ex: AMP inhibă fructoza 1,6 bifosfataza, enzima cheie în gluconeogeneza, pe când citratul o activează. Aceste substanţe au efecte opuse asupra fosfofructokinazei enzima „*pacemaker*" pentru glicoliză. Aceste procese sunt coordonate de asemenea de $F_{2,6}BP$ (fructoza 2,6 bifosfat) care inhibă gluconeogeneza şi activează glicoliza.



Fructoza 1,6-bifosfataza
– activată de citrat
– inhibată de cAMP
– inhibată de $F_{2,6}BP$

Fructoza 1,6-bifosfataza este enzima cheie de control a gluconeogenezei.

e) *Sinteza şi degradarea glicogenului.* Glicogenul reprezintă pentru organism un stoc energetic gata să fie mobilizat. Din punct de vedere chimic este un polimer ramificat al reziduurilor de glucoză. În sinteza sa, intermediarul activat este UDP-glucoza care este formată din glucoza 1-fosfat şi UTP. Enzima care catalizează transferul glucozei de la UDP-glucoză la reziduul hidroxil terminal al lanţului de creştere este glicogen sintaza. Glicogenul este degradat în diferite căi: fosforilaza catalizează scindarea glicogenului prin ortofosfat pentru a da glucoza 1-fosfat. Sinteza şi degradarea glicogenului sunt controlate de un hormon care amplifică cascada în aşa fel încât sintaza este inactivă, în timp ce fosforilaza este activă şi invers. Aceste enzime sunt reglate prin fosforilare şi interacţiuni alosterice noncovalente.

f) *Sinteza şi degradarea acizilor graşi.* Acizii graşi sunt sintetizaţi în citozol prin adiţia unor unităţi de 2 atomi de carbon la lanţul de creştere a unei lipoproteine. Intermediarul activat este format prin carboxilarea acetil CoA. Acest intermediar (malonil CoA) este format cu ajutorul grupelor acetil transportate din mitocondrie în citozol prin „naveta" citrat-malat.

Acetil CoA carboxilaza este enzima cheie pentru controlul sintezei de acizi graşi. Citratul în citozol stimulează enzima care catalizează etapa iniţială: acetil CoA carboxilaza. Atunci când ATP şi acetil CoA sunt abundente, concentraţia de citrat creşte şi accelerează rata de sinteză a acizilor graşi.

Acizii graşi sunt degradaţi în moduri diferite. În matricea mitocondrială sunt degradaţi la acetil CoA prin β-oxidare. Acetil CoA intră în ciclul acidului citric, dacă este suficient oxaloacetat. Alternativ, acetil CoA poate duce la creşterea corpilor cetonici $FADH_2$ şi NADH formaţi în calea metabolică a β oxidării, transferă electronii lor la O_2 prin lanţul de transport de electroni. Asemenea ciclului acidului citric, β oxidarea poate continua numai dacă este regenerat NAD^+ şi FAD. Pe de altă parte degradarea acizilor graşi este cuplată cu nevoia de ATP.

Nu putem înţelege factorii care guvernează fluxul moleculelor în metabolism, dacă nu examinăm trei produse metabolice cheie ale căilor de intersecţie: glucoza 6-fosfatul, piruvatul şi acetil CoA, fiecare evoluând prin mai multe căi.

Glucoza 6-fosfat. Glucoza care intră în celulă este fosforilată rapid la glucoză 6-fosfat, care poate fi stocat ca glicogen, degradat prin calea piruvatului, sau convertit în riboza 5-fosfat (figura 60).

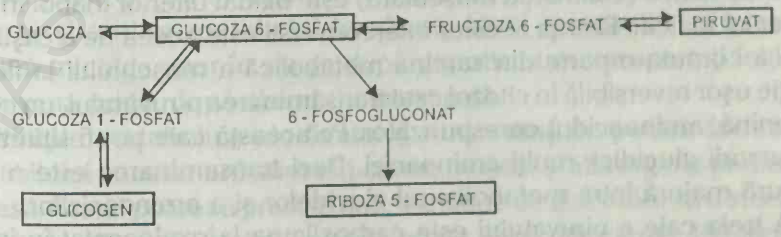


Fig. 60. Implicaţiile metabolice ale glucozo-6-fosfatului.

Glicogenul este format atunci când glucoza 6-fosfatul şi ATP sunt abundente. În contrast, glucoza 6-fosfatul merge pe calea glicolitică atunci când este solicitat pentru biosinteză ATP sau scheletul carbonic. Conversia glucoza 6-fosfatului în piruvat poate fi atât spre anabolism, cât şi către catabolism. A treia cale majoră a glucozo 6-fosfatului este spre calea pentozofosfatului, care furnizează NADPH pentru biosintezele reductive şi riboza 5-fosfat pentru sinteza nucleotidelor. Cantităţile relative a acestor doi produşi formaţi (NADPH şi ribozo 5-fosfat) pot fi ajustate printr-o serie de reacţii flexibile.

Glucoza 6-fosfatul poate fi format prin mobilizarea glicogenului sau poate fi sintetizat din piruvat şi aminoacizii glucogenici prin calea gluconeogenică. Concentraţia mică a glucozei în sânge stimulează atât glucogenoliza, cât şi gluconeogeneza în ficat şi rinichi. Numai aceste organe posedă glucozo 6-fosfataza care face posibilă eliberarea glucozei în sânge.

Piruvatul. Acest α-cetoacid tricarbonic reprezintă altă joncţiune metabolică majoră (figura 61).

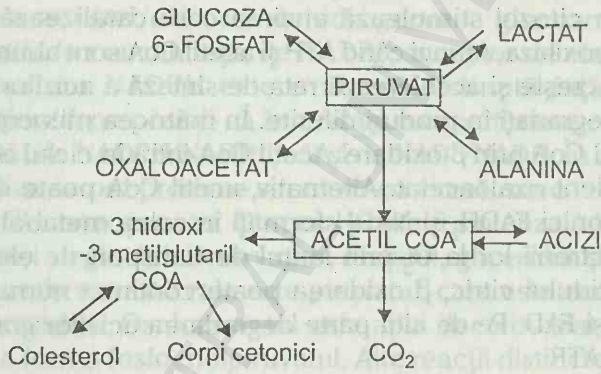


Fig. 61. Căile metabolice ale piruvatului la mamifere.

Piruvatul este derivat de la glucozo 6-fosfat, alanină şi lactat (formele reduse ale piruvatului). Reducerea cu uşurinţă a piruvatului, catalizată de lactat dehidrogenază, serveşte la regenerarea NAD^+, făcând posibil ca glicoliza să continue tranzitoriu în condiţii anaerobe. Lactatul format în ţesuturile active (contracţia musculară) este oxidat ulterior înapoi în piruvat, în special în ficat. Esenţa acestor interconversii este aceea de a câştiga timp şi de a comuta o parte din sarcina metabolică a muşchiului la ficat. Altă reacţie uşor reversibilă în citozol este transaminarea piruvatului, un cetoacid, la alanină, aminoacidul corespunzător. Pe această cale pot fi sintetizaţi din precursorii glucidici, mulţi aminoacizi. Deci transaminarea este o cale de legătură majoră între metabolismul glucidelor şi a aminoacizilor.

A treia cale a piruvatului este carboxilarea la oxaloacetat în interiorul mitocondriei. Această reacţie şi conversia ulterioară a oxaloacetatului în fosfoenolpiruvat evită o etapă ireversibilă a glicolizei şi face posibilă sinteza

glucozei din piruvat. Carboxilarea piruvatului este de asemenea importantă pentru înlocuirea intermediarilor din ciclul acidului citric. Prin activarea piruvatcarboxilazei de către acetil CoA se măreşte sinteza de oxaloacetat, când ciclul acidului citric este încetinit datorită concentraţiei scăzute ai acestor intermediari. Pe de altă parte, oxaloacetatul sintetizat din piruvat intră în calea gluconeogenică atunci când ciclul acidului citric este inhibat de concentraţia crescută de ATP.

A patra cale a piruvatului este decarboxilarea oxidativă a acetil CoA. Această reacţie ireversibilă care se petrece în interiorul mitocondriei este decisivă pentru metabolism. Calea aceasta angajează atomii de carbon ai glucidelor şi aminoacizilor la oxidare prin ciclul acidului citric sau la sinteza de lipide. Complexul piruvatdehidrogenaza, care catalizează arderea ireversibilă, este reglat de multiple interacţiuni alosterice şi modificări covalente. Piruvatul este convertit rapid în acetil CoA numai dacă este nevoie de ATP sau fragmentele de doi carboni sunt solicitate pentru sinteza de lipide.

Acetil CoA. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului şi β oxidarea acizilor graşi sunt sursele majore ale acestui metabolit cu doi atomi de carbon, activat. Acetil CoA provine de asemenea de la aminoacizii cetogenici. Soarta ei, în contrast cu multe molecule din căile metabolice, este restrictivă. Unitatea acetil poate fi oxidată complet la CO_2 în ciclul acidului citric. Alternativ poate fi format 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA din 3 molecule de acetil CoA. Această unitate cu 6 atomi de C este un precursor al colesterolului şi al corpilor cetonici, care sunt formele de transport al unităţilor acetil între ficat şi unele ţesuturi periferice. A treia cale majoră a acetil CoA este exportul ei în citozol sub formă de citrat pentru sinteza acizilor graşi. Este important să subliniem faptul că acetil CoA nu poate fi convertită în piruvat în organismul mamiferelor, deci ele nu sunt capabile să convertească lipidele în glucide.

g) *Metabolismul în ţesuturile speciale.* Distribuţia căilor metabolice este diferită în organe şi ţesuturi. Tipul de combustibil celular importat, exportat sau stocat în celulă variază de asemenea. Mai mult, profilul metabolic al majorităţii ţesuturilor şi organelor variază în funcţie de starea metabolică a corpului.

Ficatul joacă un rol esenţial în metabolism prin reglarea concentraţiei de glucoză şi a altor metaboliţi în sânge. Mulţi metaboliţi cu greutate moleculară mică ce apar în sânge după digestie sunt transportaţi iniţial la ficat prin vena portă, după absorbţia intestinală.

Activităţile metabolice ale ficatului sunt esenţiale pentru furnizarea combustibilului necesar arderilor din creier, muşchi şi alte organe periferice. După masă, ficatul poate să preia o mare cantitate de glucoză şi să o stocheze sub formă de glicogen. În felul acesta poate depozita aprox. 400 Kcal. În timpul înfometării, ficatul poate elibera glucoza în sânge prin scindarea

stocului de glicogen (glicoliza) şi prin gluconeogeneză. Precursorii importanţi ai glucozei sunt lactatul şi alanina din muşchi, glicerolul din ţesutul adipos şi aminoacizii glucogenici din dietă.

De asemenea, ficatul joacă un rol central în reglarea metabolismului lipidic. Când arderile sunt abundente, acizii graşi sunt sintetizaţi de ficat, esterificaţi şi secretaţi în sânge sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL). Lipoproteinele plasmatice sunt sursa cea mai importantă de acizi graşi folosită de ţesutul adipos pentru sinteza triglicerolului. În starea de înfometare, ficatul converteşte acizii graşi în corpi cetonici.

Alegerea dintre aceste faze contrastante este făcută de celula hepatică în funcţie de intrarea acizilor graşi în matricea mitocondrială. Lanţul lung al acizilor graşi traversează membrana internă a mitocondriei, numai dacă este esterificată. Carnitin aciltransferaza I, enzima care catalizează formarea acil carnitinei pe faţa externă a mitocondriei, este inhibată de malonil CoA, produs intermediar în sinteza acizilor graşi. Când lanţul lung al acizilor graşi sintetizat este împiedicat să intre în matricea mitocondriei, aceşti acizi graşi sunt încorporaţi în trigliceride şi fosfolipide. În schimb, concentraţia de malonil CoA este scăzută când arderile sunt mici. În aceste condiţii acizii graşi eliberaţi din ţesutul adipos intră în matricea mitocondrială şi sunt convertiţi în corpi cetonici.

Ficatul îşi furnizează energie proprie în special prin cetoacizii proveniţi din degradarea aminoacizilor, care sunt preferaţi glucozei. De fapt, scopul cel mai important al glicolizei în ficat este formarea de metaboliţi pentru biosinteze. Mai mult, ficatul nu poate folosi acetoacetatul pentru arderile proprii şi îl exportă la muşchi şi creier.

Muşchiul scheletic este cel mai mare consumator de metaboliţi şi oxigen, având în vedere masa mare în comparaţie cu alte ţesuturi. Majoritatea combustibilului metabolic pentru muşchi este format din glucoză, acizi graşi şi corpi cetonici.

Muşchiul are un stoc mare de glicogen (aprox. 1200 Kcal) care furnizează o sursă de glucoză pentru energia din timpul activităţii. Aprox. 3/4 din întreaga cantitate de glicogen din corp este stocată în muşchi. Glicogenul conţinut în muşchi după prânz poate fi de aprox. 1%. Acesta este convertit rapid în glucoza 6-fosfat pentru a fi folosit de celula musculară. Ca şi creierul, muşchiul este lipsit de glucoza 6-fosfatază, deci nu poate exporta glucoza. Cu toate acestea muşchiul reţine glucoza, care este combustibilul preferat în timpul activităţii. În contracţia activă a muşchiului scheletic, rata glicolizei este mult mărită faţă de cea a acidului citric. Piruvatul produs în timpul glicolizei în muşchi poate fi convertit fie în lactat, fie în alanină şi exportat la ficat, unde este folosit la regenerarea stocului de glucoză via gluconeogeneza (figura 62).

Schema metabolismului muşchiului scheletic în repaus este diferită. În acest caz, combustibilul major este constituit din acizi graşi.

Muşchiul inimii diferă de muşchiul scheletic în următoarele căi metabolice: activitatea muşchiului inimii este mai puţin variată în comparaţie cu cea a muşchiului scheletic; muşchiul inimii este un ţesut complet aero-

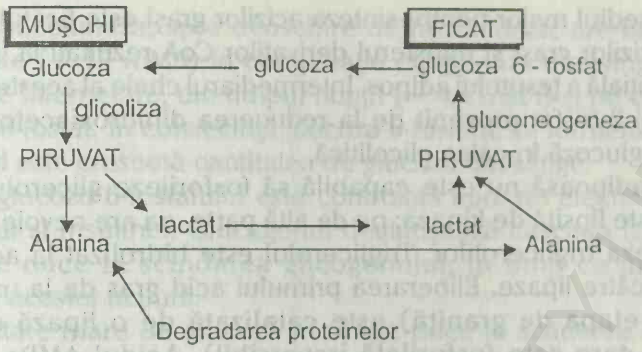


Fig. 62. Modalităţile de convertire a piruvatului în organism.

bic, în timp ce muşchiul scheletic are capacitatea limitată la funcţia anaerobică; muşchiul inimii nu conţine rezerve esenţiale şi de aceea trebuie să fie aprovizionat continuu cu metaboliţi din sânge. Glucoza, acizii graşi şi corpii cetonici sunt combustibilul pentru metabolism. De fapt, muşchiul inimii consumă preferenţial acetoacetatul faţă de glucoză.

Ţesutul adipos. Funcţia principală a ţesutului adipos este stocarea metaboliţilor sub formă de trigliceride. Triglicerolul stocat în ţesutul adipos este un enorm rezervor pentru arderile metabolice. Energia lui este foarte mare ~ 135 000 Kcal pentru un om de 70 kg (fig. 63).

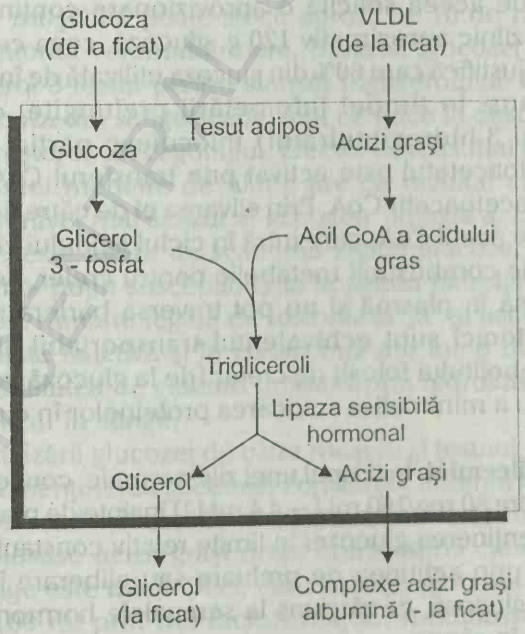


Fig. 63. Sinteza şi degradarea glicerolului în ţesutul adipos. Acizii graşi sunt furnizaţi celulelor adipoase sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La om sediul major pentru sinteza acizilor graşi este ficatul, în timp ce activarea acizilor graşi şi transferul derivaţilor CoA rezultaţi la glicerol este sarcina esenţială a ţesutului adipos. Intermediarul cheie al acestei biosinteze este glicerol 3-fosfat provenit de la reducerea dihidroxiaceton-fosfatului rezultat din glucoză în calea glicolitică.

Celula adipoasă nu este capabilă să fosforileze glicerolul endogen deoarece este lipsită de kinază; pe de altă parte, ea are nevoie de glucoză pentru sinteza triglicerolilor. Triglicerolul este hidrolizat la acizi graşi şi glicerol de către lipaze. Eliberarea primului acid gras de la un triglicerol (care este etapa de graniţă) este catalizată de o lipază cu acţiune hormonală care este fosforilată ireversibil). Acidul AMPc, care este mesagerul intracelular în această cascadă amplificată hormonal, activează o protein kinază (un mod de acţiune hormonală). Triglicerolii sunt continuu hidrolizaţi şi resintetizaţi în ţesutul adipos. Glicerolul provenit din hidroliza lor este exportat la ficat. Dacă glicerol 3-fosfatul este abundent, o mare parte din acizii graşi formaţi prin hidroliză sunt reesterificaţi. În cazul în care glicerolul este în cantitate mică datorită concentraţiei mici de glucoză, acizii graşi formaţi sunt eliberaţi în plasmă. Deci concentraţia de glucoză în interiorul ţesutului adipos este un factor major pentru a determina eliberarea acizilor graşi în sânge.

Creierul uman – pentru acesta glucoza este virtual metabolitul esenţial, cu excepţia timpului de înfometare prelungit. Creierul este lipsit de rezerve de combustibil, de aceea solicită o aprovizionare continuă cu glucoză. Acesta consumă zilnic aproximativ 120 g. glucoză, ceea ce corespunde la aprox. 420 Kcal şi justifică cam 60% din glucoza utilizată de întreg organismul în stare de repaus. În timpul înfometării prelungite, corpii cetonici (acetoacetatul şi 3-hidroxibutiratul) înlocuiesc parţial glucoza drept combustibil. Acetoacetatul este activat prin transferul CoA de la succinil CoA, pentru a da acetoacetil-CoA. Prin clivarea ei de către tiolază se produc două molecule de acetil CoA, care intră în ciclul acidului citric. Acizii graşi nu sunt o sursă de combustibil metabolic pentru creier, pentru că ei sunt legaţi de albumină în plasmă şi nu pot traversa bariera sânge-creier. În esenţă corpii cetonici sunt echivalentul transportabil al acizilor graşi. Schimbarea metabolitului folosit de creier (de la glucoză la corpi cetonici) este critică pentru a minimaliza scindarea proteinelor în cursul înfometării prelungite.

7. **Reglarea glicemiei.** În timpul unei zile normale, concentraţia glucozei în sânge variază între 80 mg/100 ml (~ 4,4 mM/l) înainte de masă şi 120 mg/100 după masă. În menţinerea glucozei în limite relativ constante un rol important îl are ficatul prin acţiunea de preluare sau eliberare în sânge a unei mari cantităţi de glucoză, ca răspuns la semnalele hormonale sau chiar a nivelului glucozei în sânge.

Cantitatea de glucoză crescută, provenită din glucidele ingerate odată cu alimentele, duce la creşterea glucozei 6-fosfatului în ficat, deoarece numai atunci centrele catalitice ale glucokinazei sunt saturate cu glucoză. După

cum ştim, glucokinaza, spre deosebire de hexokinaza, are un K_M pentru glucoză mare (~ 10 mM/l) în comparaţie cu glucoza din sânge în timpul perioadei de înfometare, din timpul nopţii (~ 4,4 mM/l) şi nu este inhibată de glucozo 6-fosfat. În consecinţă glucoza 6-fosfatul se formează mai rapid în ficat când este crescută cantitatea de glucoză din sânge.

Soarta glucozo 6-fosfatului este controlată apoi de efectele opuse ale glucagonului şi insulinei. Glucagonul declanşează cascada (mediată) de AMPc, care duce la scindarea glicogenului, în timp ce insulina este antagonista acestei acţiuni.

O cantitate mare de glucoză în sânge duce la scăderea secreţiei de glucagon şi creşterea secreţiei de insulină de către pancreas. În consecinţă, când concentraţia de glucoză din sânge este mare glicogenul se sintetizează rapid. Efectul hormonal asupra sintezei şi stocajului de glicogen este întărit de acţiunea directă a glucozei. Fosforilaza „a" este o enzimă care clivează glicogenul şi totodată este un senzor al nivelului glucozei. Când nivelul glucozei este mare, legarea glucozei la fosforilaza „a" o face susceptibilă la acţiunea fosfatazei; aceasta o converteşte în fosforilaza b, care nu degradează glicogenul. Această conversie eliberează fosfataza care îi permite să activeze glicogen-sintaza. Deci, glucoza schimbă alosteric sistemul glicogen, de la degradare la sinteză.

Cantitatea mare de insulină după masă favorizează intrarea glucozei în muşchi şi ţesutul adipos. Insulina stimulează sinteza glicogenului în muşchi şi ficat. De fapt muşchiul poate stoca aprox. de 10 ori mai mult glicogen decât ficatul, datorită volumului mare. Intrarea glucozei în ţesutul adipos furnizează glicerol 3-fosfat pentru sinteza triglicerolului. La mai multe ore după masă, glucoza din sânge scade, fapt ce duce la descreşterea secreţiei de insulină şi creşterea glucagonului. Efectul descris mai sus se inversează. Activarea cascadei mediate de AMPc are ca rezultat creşterea nivelului fosforilazei şi un nivel mai scăzut al glicogen sintazei a. Efectul hormonilor asupra cascadei este întărit de scăderea legării glucozei la fosforilaza „a", fapt ce o face mai puţin susceptibilă la acţiunea hidrolitică a fosfatazei. În schimb, fosfataza rămâne legată de fosforilaza „a" şi astfel sintaza rămâne în forma fosforilată inactivă şi în consecinţă are loc o mobilizare rapidă a glicogenului. Cantitatea de glucoză produsă prin hidroliza glicogenului este eliberată de la ficat în sânge.

Scăderea utilizării glucozei de către muşchi şi ţesutul adipos, contribuie de asemenea la menţinerea glicemiei constante. Intrarea glucozei în muşchi şi ţesutul adipos scade deoarece nivelul insulinei este mic. Atât muşchiul, cât şi ficatul folosesc acizii graşi drept combustibil când concentraţia de glucoză din sânge este mică. Deci: concentraţia glucozei este menţinută la aprox. 80 mg/100 ml prin trei factori majori: mobilizarea glicogenului şi eliberarea de glucoză de către ficat; eliberarea de acizi graşi de către ţesutul adipos; înlocuirea glucozei cu acizii graşi pentru arderile metabolice din muşchi şi ficat (fig. 64).

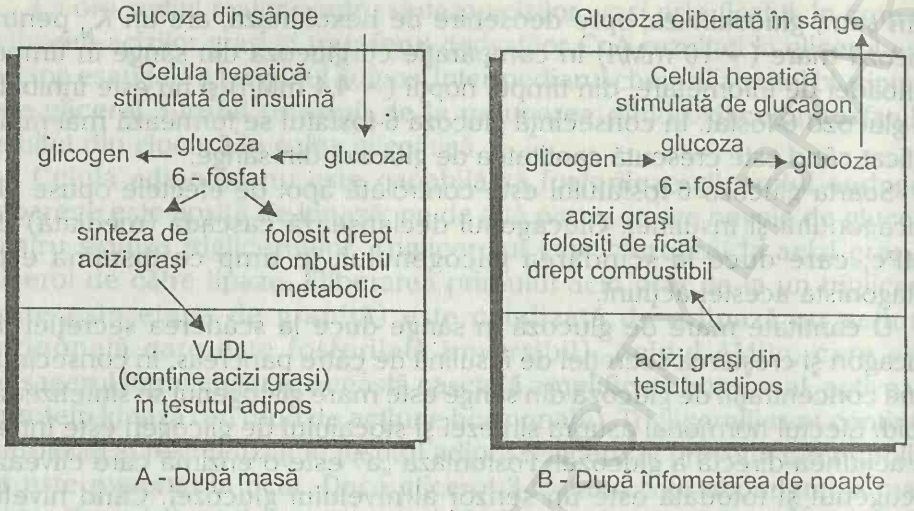


Fig. 64. Controlul glucozei din sânge de către ficat.

Adaptarea metabolismului la post prelungit, pentru a proteja consumul de proteină.

Un om de 70 de kg, bine hrănit, are rezerve energetice de aprox. 1600 Kcal sub formă de glicogen, 24 000 Kcal în proteine ce pot fi mobilizate şi 135 000 Kcal sub formă de trigliceride.

Energia necesară pentru o perioadă de 24 h este de la 1600 Kcal în stadiul bazal, până la 6000 Kcal, în funcţie de activitatea susţinută. Rezervele de energie ar fi suficiente pentru o perioadă de 1-3 luni. Totuşi rezervele de carburanţi sunt epuizate numai după o zi de înfometare. Chiar şi în aceste condiţii nivelul glucozei în sânge este menţinut la aprox. 50 mg/100 ml. Creierul nu poate tolera o scădere mare de glucoză chiar pentru o perioadă scurtă de timp. Deci prioritatea numărul unu a metabolismului în caz de înfometare este furnizarea de glucoză suficientă pentru creier şi alte ţesuturi (ex: hematiile, care sunt absolut dependente de acest combustibil).

Precursorii glucozei nu sunt abundenţi. Mare parte din energie este stocată în nucleul acizilor graşi ai trigliceridelor. Acizii graşi nu pot fi convertiţi în glucoză, deoarece acetil CoA nu poate fi convertită în piruvat. Nucleul glicerol al trigliceridelor poate fi convertit în glucoză, dar este disponibil numai în cantitate foarte mică. O sursă potenţială de glucoză o constituie aminoacizii proveniţi din scindarea proteinelor, sursa cea mai importantă constituind-o proteinele din muşchi. A doua prioritate a metabolismului în înfometare este conservarea proteinelor. Acest fapt este îndeplinit prin schimbarea arderilor cu consum de glucoză spre acizi graşi şi corpi cetonici. În timpul înfometării creşte concentraţia de acizi graşi şi corpi cetonici, în timp ce concentraţia de glucoză scade. În timpul primei zile de înfometare, schimbările metabolice sunt asemănătoare cu cele produse după înfometarea de noapte. Nivelul scăzut al glucozei din sânge duce la descreşterea secreţiei de insulină şi creşterea secreţiei de glucagon.

Procesele metabolice dominante sunt mobilizarea trigliceridelor din ţesutul adipos şi gluconeogeneza din ficat. Ficatul obţine energie prin oxidarea acizilor graşi eliberaţi de ţesutul adipos; de asemenea muşchiul îşi schimbă combustibilul de la glucoză la acizi graşi. ß-oxidarea acizilor graşi de către muşchi opreşte conversia piruvatului în acetil CoA. Piruvatul, lactatul şi alanina sunt exportate la ficat pentru conversia în glucoză. Liza proteinei din muşchi furnizează precursorii tricarbonici pentru glucoză. De asemenea intermediarii glicerolului proveniţi din clivarea trigliceridelor sunt alt material pentru sinteza glucozei de către ficat. După aprox. trei zile de înfometare, cea mai importantă schimbare este sinteza corpilor cetonici în ficat, din acetil CoA. Sinteza corpilor cetonici din acetil CoA creşte, deoarece ciclul acidului citric nu este capabil să oxideze toate unităţile acetil generate din degradarea acizilor graşi. Gluconeogeneza goleşte stocul de oxaloacetat, care este esenţial pentru intrarea acetil CoA în ciclul acidului citric şi în consecinţă ficatul produce o cantitate mare de corpi cetonici pe care îi eliberează în sânge. În acest timp creierul începe să consume o cantitate apreciabilă de acetoacetat în loc de glucoză. După trei zile de înfometare, aproximativ 1/3 din energia necesară creierului este dată de corpii cetonici. De asemenea inima foloseşte drept combustibil corpii cetonici. Schimbările de combustibil energetic duc la creşterea cetonemiei.

După mai multe săptămâni de înfometare, corpii cetonici devin combustibil major pentru creier; numai 40 g glucoză pe zi sunt necesare pentru creier, în comparaţie cu aproximativ 120 g în prima zi de înfometare. Conversia acizilor graşi în corpi cetonici, care se produce în ficat şi folosirea acestora de către creier, diminuează mult nevoia de glucoză. Pe de altă parte, mai puţin muşchi este degradat decât în primele zile de înfometare (20 g muşchi în comparaţie cu 75 g la începutul perioadei de înfometare), fapt foarte important pentru supravieţuire. Durata de înfometare compatibilă cu viaţa este determinată de mărimea depozitului de triacilglicerol.

Dereglările produse în diabet de insuficienţa relativă a insulinei şi excesul de glucagon.

Diabetul, denumit astfel datorită urinării excesive în cursul bolii, a fost semnalat încă din sec. II d.Ch. de către Aretaeus, un medic din Cappadocia.

Se cunosc două tipuri de diabet.

– Diabet insulin dependent (tip I) produs de incapacitatea corpului de a produce insulină. Aceasta se produce prin distrugerea celulelor ß din pancreas, care sintetizează insulina. Instalarea bolii este abruptă şi se produce înainte de 40 de ani, de aceea este cunoscută uneori ca diabet juvenil.

– Diabet non insulin dependent (tip II) produs de o deficienţă sau un defect în receptorii insulinei. Organismul este încă în stare să producă insulina, dar acesta nu răspunde la stimulul hormonal. Începutul bolii se produce adesea după vârsta de 40 de ani. Bolnavii sunt de obicei supraponderali şi au în familie persoane diabetice.

Anomaliile metabolice ale diabetului insulin dependent. Deoarece producerea de insulină este defectuoasă, nivelul ei este foarte scăzut faţă

de nivelul glucagonului. Nivelul excesiv de glucagon faţă de insulină duce la o descreştere a cantităţii de $F_{2,6}BP$ în ficat, de aceea glicoliza este inhibată şi este stimulată gluconeogeneza.

Profilul metabolic este foarte asemănător cu cel din timpul înfometării, cu toate că metaboliţii sunt abundenţi: preluarea glucozei de către ţesuturi este defectuoasă, în ciuda faptului că glucoza este eliberată de ficat; glicoliza este scăzută; gluconeogeneza este stimulată; lipoliza trigliceridelor este stimulată; sinteza de acizi graşi şi triglicerol este inhibată; oxidarea acizilor graşi este crescută; stocarea glicerolului este depresată; corpii cetonici sunt sintetizaţi în ficat şi folosiţi ca metaboliţi în alte ţesuturi; proteinele sunt degradate şi aminoacizii sunt folosiţi ca metaboliţi; cantitatea de glucoză, acizi graşi şi corpi cetonici din ser creşte foarte mult; excesul de glucoză duce la glicozilarea hemoglobinei şi posibil a altor proteine.

O trăsătură importantă a diabetului este comutarea folosirii combustibilului energetic de la glucide la grăsimi, glucoza fiind refuzată drept combustibil. Când concentraţia de glucoză în sânge este excedentară şi depăşeşte capacitatea de reabsorbţie a tubilor renali, glucoza este excretată în urină. Apa însoţeşte excreţia de glucoză şi astfel diabetul netratat în fază acută a bolii duce la înfometarea organismului şi însetarea lui. Pierderea glucozei sărăceşte organismul de stocul de glucide, fapt ce duce la scindarea grăsimilor şi a proteinelor.

Mobilizarea grăsimilor duce la formarea unei mari cantităţi de acetil CoA, care nu poate intra în ciclul acidului citric, deoarece este insuficient oxaloacetat pentru etapa de condensare (mamiferele pot sintetiza oxaloacetat din piruvat, un produs al glicolizei, dar nu din acetil CoA, în schimb ele generează corpi cetonici). În concentraţie mare corpii cetonici depăşesc capacitatea rinichiului de a menţine balanţa acido-bazică. Diabetul netratat poate produce comă, deoarece pH-ul sângelui scade foarte mult.

Deci, cele mai importante manifestări clinice ale diabetului netratat sunt: hiperglicemia (concentraţia mare a glucozei în sânge); creşterea eliminării urinare a glucozei (glicozuria); dehidratarea şi dereglarea balanţei de electroliţi prin creşterea eliminării de urină; acidoza din cauza cantităţii mari de corpi cetonici în sânge – acetona şi ß hidroxibutiratul sunt acizi ce nu pot fi excretaţi de plămân şi strică balanţa acido-bazică, pH-ul scade foarte mult şi dacă nu este corectat poate duce la comă şi deces; neuropatii datorită acumulării de sorbitol în celulele Schwan şi alte celule afectate; insuficienţa renală; retinopatii şi orbire.

Glucoza reacţionează cu hemoglobina pentru a forma un indicator relevant al concentraţiei de zahăr în sânge. Unul dintre obiectivele tratamentului diabetului este scăderea cantităţii de glucoză din sânge. Un indicator util a fost găsit în deteriorarea transportului de oxigen. Durata de viaţă a hematiilor este de 120 de zile; în acest timp glucoza, glucoza 6-fosfatul şi alte zaharuri reacţionează neenzimatic pentru a forma conjugaţi stabili cu grupările- amino ale lanţurilor β ale hemoglobinei. Gruparea aldehidă a formei de lanţ deschis al glucozei se condensează cu grupul- amino pentru a forma o bază Schiff.

Această reacţie reversibilă este urmată de o rearanjare ireversibilă în care dubla legătură se mută la C_2 al glucidului, pentru a da un derivat fructozo al hemoglobinei, stabil, denumit hemoglobina A_{Ic} care are proprietăţi electroforetice alterate. Hematiile tuturor oamenilor conţin o cantitate mică (3-5%) proporţională cu concentraţia de glucoză din sânge. La diabetici proporţia de hemoglobină A_{Ic} este mult mai mare (6-15%). Hemoglobina A_{Ic} ne arată concentraţia de glucoză din sânge pe o perioadă de mai multe săptămâni, de aceea măsurarea HbA_{Ic} la intervale de câteva săptămâni este foarte utilă pentru monitorizarea tratamentului. De asemenea HbA_{Ic} este un model al felului în care proteinele pot fi deteriorate de concentraţia mare de glucoză. Mulţi diabetici dezvoltă complicaţii degenerative ca leziuni aterosclerotice ale vaselor sanguine, după ani de la instaurarea simptomelor metabolice. Ipoteza de lucru este că în diabet complicaţiile se datorează ataşării covalente a glucozei la proteine ca hemoglobina A_{Ic}. În prezent, controlul riguros al hiperglicemiei cu ajutorul HbA_{Ic} este de un real folos în monitorizarea tratamentului diabeticilor.

O sinteză a mecanismelor de reglare a metabolismului în majoritatea ţesuturilor din organism şi la nivel celular este ilustrată în figurile 65 şi 66.

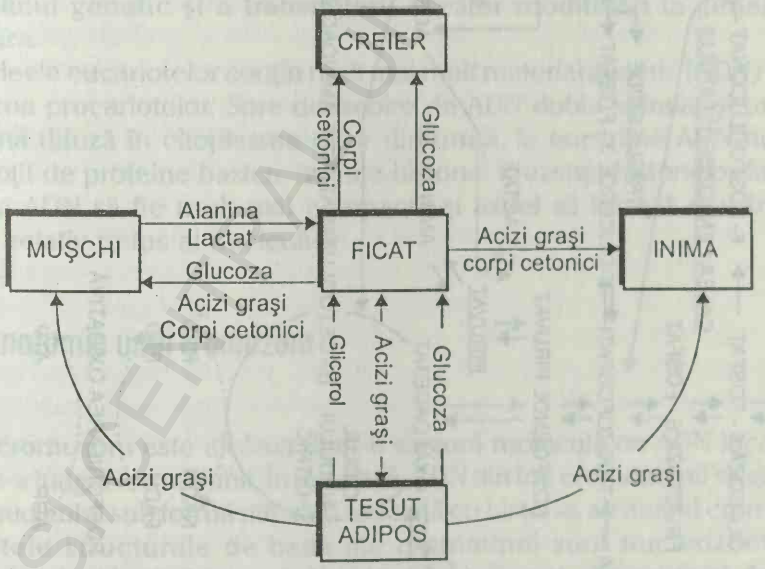


Fig. 65. Integrarea metabolismului în majoritatea ţesuturilor din corp. Fluxul prin sânge spre şi de la ţesuturi al metaboliţilor cheie este indicat prin săgeţi.

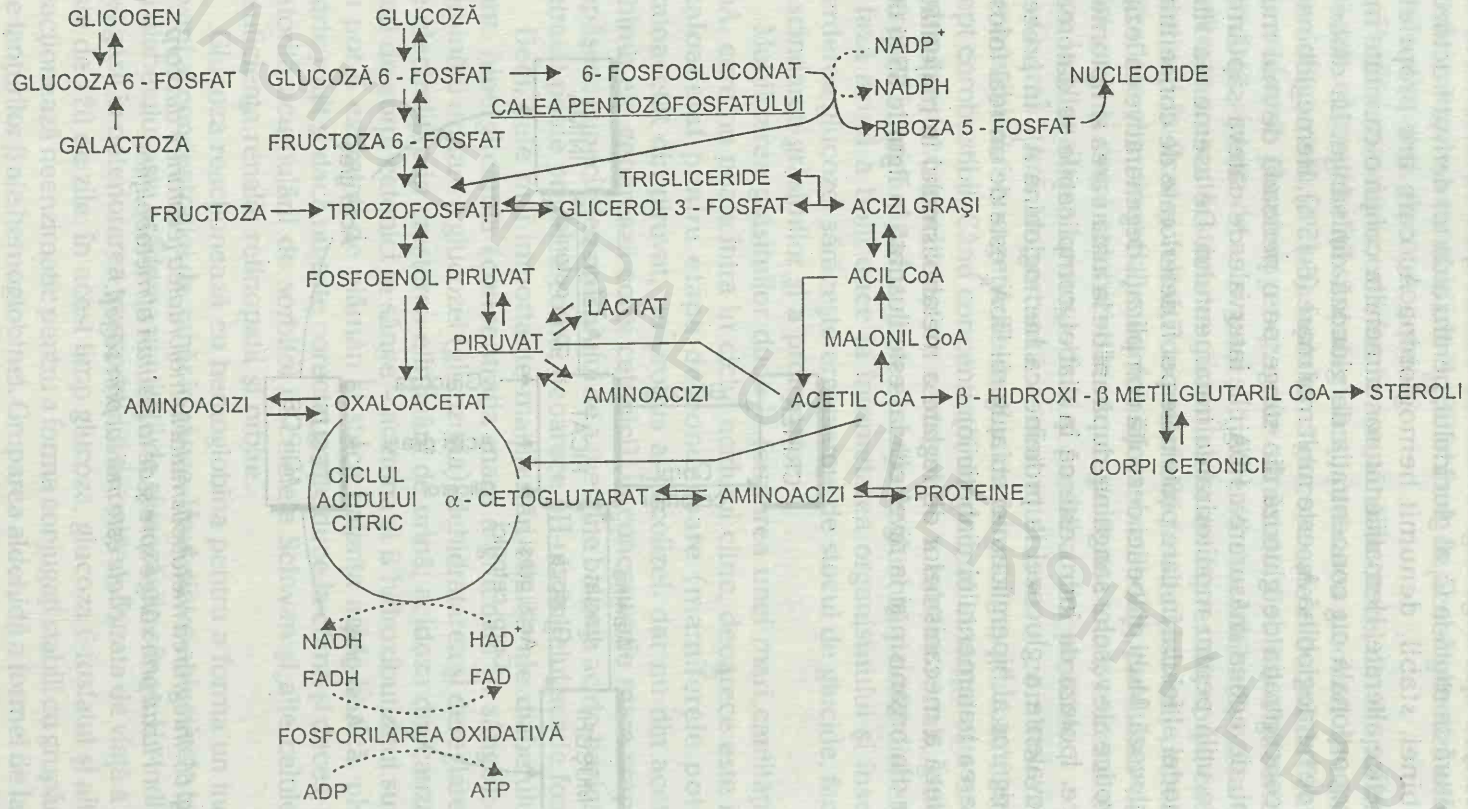


Fig. 66. Integrarea metabolismului la nivel celular. Fluxul metaboliţilor cheie spre şi între diferitele căi metabolice este indicat prin săgeţi. Săgeţile care leagă metaboliţii reprezintă mai mult decât o singură etapă a reacţiei.

BCU IAȘI "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

4.5. Elemente de genetică medicală

Faptul că moştenirea de către urmaşi a proprietăţilor morfologice şi funcţionale ale părinţilor este legată de existenţa şi funcţionarea unor factori invizibili postulaţi ca gene, localizate în cursul diviziunii în cromozomii nucleului celular, a fost cunoscut încă de la începutul secolului nostru (Thomas Hunt Morgan, premiul Nobel pentru medicină, 1930). Pe baza rezultatelor experienţelor efectuate pe nenumărate generaţii de *Drosophyla melanogaster*, Thomas Hunt Morgan şi August Weismann au putut formula proprietăţile caracteristice ale acestor factori invizibili:

a) capacitatea determinării proprietăţilor structurale şi funcţionale ale indivizilor şi urmaşilor lor;

b) localizarea lor lineară în cromozomi;

c) capacitatea autoreproducerii realizate prin cuplarea şi transmiterea în celulele fiice în cursul diviziunilor celulare a materialului genetic identic şi corespunzător;

d) capacitatea de a produce mutaţii prin modificarea structurii materialului genetic şi a transmiterii acestor modificări la generaţiile următoare.

Nucleele eucariotelor conţin mult mai mult material genetic (ADN) decât citoplasma procariotelor. Spre deosebire de ADN dublu spiralat şi prezent sub formă difuză în citoplasma celor din urmă, la eucariote ADN nuclear este însoţit de proteine bazice, numite histone. Prezenţa histonelor face ca structura ADN să fie mult mai compactă şi astfel să încapă mai bine în volumul relativ redus al nucleului.

4.5.1. Anatomia unui cromozom

Un cromozom este alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN localizată linear de-a lungul formaţiunii. În interfază, ADN din toţi cromozomii se găseşte în jurul nucleului sub formă difuză şi asociată cu histone, alcătuind cromatina. Elementele structurale de bază ale cromatinei sunt nucleozomii, cu dimensiuni de 11x11x5,5 nm (110x110x55 Å) formaţi din porţiuni de ADN dublu spiralate şi răsucite spre stânga în jurul unui centru format din molecule de histone, desemnat cu H_2A, H_2B, H_3 şi H_4. Porţiunea răsucită de ADN conţine 140 de perechi de baze; partea exterioară este cuplată cu o altă histonă (H_1), iar pe cele două capete se găsesc porţiuni de ADN neacoperite de histone. Aceste porţiuni se numesc ADN cuplant (*linker*) deoarece leagă doi nucleozomi vecini, dar în acelaşi timp prin mobilitatea lor asigură şi flexibilitate cromatinei (figura 67).

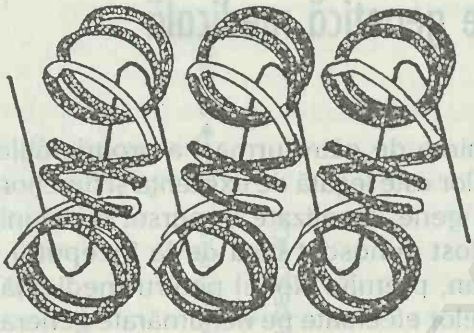


Fig. 67. Schema structurii nucleozomilor.

Existenţa nucleozomilor reprezintă primul nivel al condensării ADN în nucleu, necesar pentru cuprinderea unei mase cât mai mari de material genetic în volumul nuclear limitat. S-a constatat că lungimea unei porţiuni lineare de ADN, care conţine 200 perechi de baze, ar fi de 68 nm (680 Å). Acelaşi lanţ, sub forma răsucită, încape însă bine într-un nucleozom cu lungimea de 11 nm (110 Å).

Nivelul următor al condensării îl constituie răsucirea următoare a nucleozomilor, cuplaţi între ei în segmente formate din 6 unităţi. Aceste structuri condensează mai mult material ADN şi stabilizează structura cromozomilor în cursul diviziunii celulare şi uşurează deplasarea acestora spre nucleii viitori ai celulelor fiice. În cursul replicării ADN, furcile de despiralare pot fi iniţiate în mai multe puncte (chiar câteva mii). Moleculele histonelor rămân fixate pe suprafaţa unei semispirale, iar pe cealaltă semispirală se formează din nou. Este de remarcat faptul că genele care modifică histonele sunt prezente în ADN chiar şi în 400-500 de exemplare.

Spre deosebire de procariote, la eucariote transcrierea materialului genetic ADN în ARNm este discontinuă, secvenţele transcriptibile (exonii) sunt întrerupte de cele mute (introni). În plus, intronii se transcriu întâi într-o moleculă provizorie ARN care se transformă în ARNm monocistronic, printr-o serie de modificări post trancripţionale (metilări, transferări de grupări guanozinice). Ca urmare, expresia genetică este condiţionată nu numai de măsura în care codonii din ADN se transcriu în ARNm, dar şi de soarta acestor produşi de ARNm primar, dacă vor fi descompuşi sau transformaţi definitiv în ARNm.

Totalitatea materialului genetic depozitat sub formă de ADN se numeşte genom. La eucariote este organizat pe mai multe niveluri în cromozomi, dar şi în mitocondrii. Deoarece în cursul multiplicării celulelor germinative, numărul cromozomilor scade la jumătate faţă de cel existent în celulele somatice, genomul eucariotelor corespunde cantităţii de ADN din cromozomi. În cazul unei poliploidii, mai ales la unele plante, genomul normal se consideră egal cu numărul minim de cromozomi găsit la reprezentanţii speciei.

Genotipul este suma totalităţii purtătorilor informaţiilor genetice (genelor) care determină forma de prezentare exterioară şi particularităţile

funcţionale ale individului, inclusiv materialul genetic din citoplasmă (mitocondriile, plastidele), adică plasmotipul.

Fenotipul corespunde formei de prezentare exterioară (somatică şi a manifestărilor funcţionale ale individului, care reflectă alături de proprietăţile generale ale speciei şi pe cele speciale ale individului. Cu alte cuvinte, fenotipul reprezintă acea porţiune a posibilităţilor cuprinse în genom care se realizează conform condiţiilor existente.

Acţiunea pleiotropă a genei constă în faptul că o singură genă comandă apariţia mai multor proprietăţi sau face posibilă acţionarea unui produs genetic în mai multe regiuni ale organismului. Acţiunea heterotropă înseamnă, în schimb, că un marker sau o proprietate a organismului stă sub influenţa reglatoare a mai multor gene.

Spre deosebire de celulele somatice diploide, care dispun fiecare de un număr dublu de cromozomi, celulele germinative ale organismelor superioare sunt haploide, deoarece conţin din fiecare cromozom numai un singur exemplar. Din aşezarea lineară a genelor de-a lungul cromozomilor, reiese că, în cazul unei perechi de cromozomi, în cartografia cromozomilor, unitatea de măsură este numită centimorgan (CM). Un CM înseamnă acea distanţă minimă exprimată în nm, între două porţiuni ale cromozomilor omologi, care creează posibilitatea de 1% a unei schimbări încrucişate a materialului genetic.

4.5.2. Genele și mediul înconjurător

Descoperirea mecanismului transmiterii informaţiilor genetice a dus la formularea unei concepţii care ulterior a devenit dogma centrală a geneticii. Conform acestei dogme, transmiterea informaţiilor genetice are loc numai într-un singur sens: dinspre ADN nuclear, prin intermediul ARNm, spre ribozomii din citoplasmă. La nivelul acestora, informaţia se traduce în realizarea produşilor genetici diferiţi, adică în biosinteza de proteine variate. Valabilitatea dogmei centrale a fost totuşi infirmată ulterior de Haward H. Temin, Renato Dulbecco şi David Baltimore (premiul Nobel pentru medicină, 1975) prin descoperirea fluxului în sens opus al informaţiei genetice, adică pornită din citoplasmă spre ADN nuclear. Aceşti cercetători au descoperit că particulele retrovirusurilor, având material genetic format din ARN, conţin o enzimă ARN sintetaza cu transcripţie inversă (*Reversal Transcriptase*) care transcrie informaţiile din ARN viral în ADN nuclear al celulelor infectate (figura 68).

Teoretic ar fi posibil ca informaţiile genetice cuprinse în ARN viral să fie traduse prin analogie cu ARNm, în mod direct la nivelul ribozomilor celulelor gazdă. Acest lucru nu este realizabil totuşi din cauza diferenţelor substanţiale ale celor două feluri de ARN. Transcriptaza inversă transcrie deci secvenţa codonilor din ARN viral în ADN nuclear dublu spiralat. Porţiunile de ADN

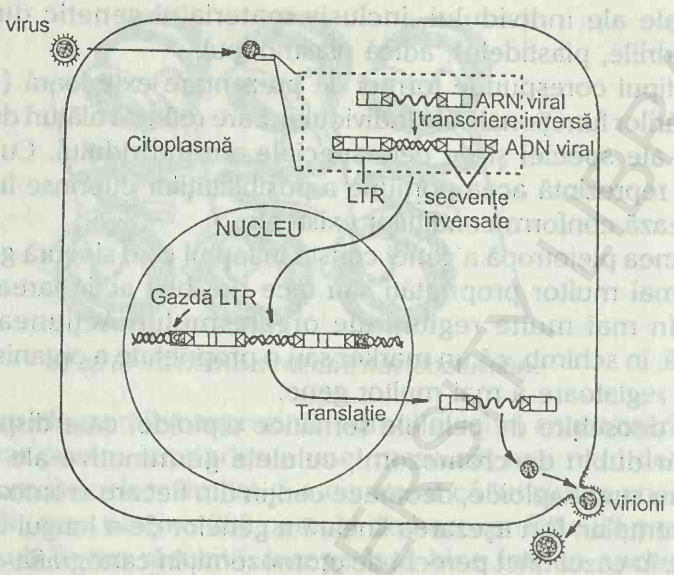


Fig. 68. Mecanismul transcripţiei inverse (explicaţia în text).

nou sintetizate conţin la ambele capete terminale câte o piesă lungă de ADN, care conţine câteva sute de baze, numite piese terminale lungi, care se repetă LTR (*Long Terminal Repeats*). Secvenţa bazelor din aceste piese terminale este inversată, ca în cazul obiectului şi al imaginii sale în oglindă.

Porţiunile ADN formate în citoplasma celulelor infectate, care conţin informaţia genetică virală transcrisă din ARN în ADN, sunt transportate în nucleu, unde prin intervenţia pieselor RTL sunt cuprinse în materialul genetic al unui cromozom. În cursul acestui proces se formează la ambele capete ale ADN primitiv o secvenţă proprie de baze, numită secvenţa repetată a gazdei (*Host Sequence Repeat*). Prin aceasta, materialul genetic al ARN viral a fost cuprins în genomul celulei gazdă. Howard H. Temin a caracterizat această stare ca provirus, care în raport cu starea funcţională a genelor poate rămâne în repaus pe o perioadă de timp mai mult sau mai puţin lungă. În urma unei activări întâmplătoare, provirusul poate fi transcris oricând în ARNm, fapt ce duce la producerea citoplasmatică a componenţilor virionilor, urmată de autoasamblarea acestora.

Comportarea intracelulară dinamică a retrovirusurilor se aseamănă mult cu proprietăţile elementelor genetice mobile ale genoamelor numite transpozoni. Pentru descoperirea transpozonilor din genomul porumbului, Barbara Mc Clintock a fost laureată cu premiul Nobel pentru medicină, în 1983. Ulterior, s-a confirmat că transpozonii sunt prezenţi în genomul tuturor vieţuitoarelor, alcătuind, de exemplu, circa 10% din genomul uman. Elementele genetice mobile, în repaus, pot fi activate atât prin factori endogeni, cât şi exogeni. Este remarcat faptul că pe capetele terminale ale acestor particule se găsesc secvenţe repetate ale bazelor asemănătoare LTR şi faptul că replicarea lor are loc tot prin ARN, sub acţiunea transpeptidazei inverse. Pe baza acestor considerente, ele au fost denumite recent retrotranspozoni.

4.5.3. Recombinările genetice

În cursul progresării explozive a cercetărilor genetice, o fază crucială a însemnat aplicarea directă în practică a descoperirilor efectuate. Dintre aceste aplicări, primele realizări au însemnat recombinările genetice, prin fragmentarea pe cale enzimatică a semispiralelor macromoleculelor ADN. În bacilii Coli, aceste recombinări sunt controlate de gene rec. Un complex proteic numit rec-BC, având acţiune de ADN-nuclează, formează întâi molecule mari de ADN-monospiralate, pe care ulterior le descompune în fragmente mai mici.

Elaborarea tehnologiei manipulărilor genetice a devenit posibilă în urma a două descoperiri substanţiale: identificarea enzimelor endonucleaze restrictive de Daniel Nathns, Werner Arber şi Hamilton O. Smith, laureaţi ai premiului Nobel pentru medicină în anul 1978, precum şi elaborarea metodei determinării secvenţei bazelor din fragmente de ADN de către Allan Maxam şi Walter Gilbert.

Endonucleazele restrictive se găsesc în diferite bacterii. Ele acţionează prin recunoaşterea şi scindarea unor anumite secvenţe de baze din ADN de origine exogenă. Enzimele nu atacă ADN propriu, deoarece la nivelul punctelor de recunoaştere bazele acestea sunt apărate prin metilarea grupărilor amino. Denumirea acestor enzime se face după microorganismul din care ele pot fi extrase, de exemplu: ADN-aza eco provine din *Escherichia Coli*, cea numită hin din *Haemophilus influenzae* etc. Stabilirea secvenţei bazelor din fragmentele ADN se bazează pe marcarea unuia dintre cele două capete terminale ale acestora cu fosfat radioactiv (P^{32}). Fragmentele se scindează apoi în produşi mai mici marcaţi radioactiv, care pot fi separaţi şi identificaţi cu ajutorul electroforezei în gel de acrilamidă. Prima moleculă ADN biologic activă, a cărei secvenţă de bază a fost descifrată de Fred Sanger, a fost ADN-ul bacteriofagului-X-174 al bacililor Coli. Ulterior Robert Sinsheimer a constatat că acest ADN este alcătuit dintr-o singură semispirală răsucită. În bacilii Coli însă, aceste semispirale se transformă într-o spirală dublă, ceea ce corespunde formei replicative a virusului. Este tot meritul virusologului Robert Sinsheimer pentru realizarea obţinerii *in vitro* a formei dublu spiralate, folosind drept model secvenţa de baze a semispiralei solitare. Porţiunile macromoleculelor ADN extrase din nucleul celulelor pot fi fragmentate şi recombinate *in vitro*. În cazul în care aceste fragmente sunt funcţionale, cu ajutorul unor vectori potriviţi (plasminele) ele pot fi introduse în microbi, în care se pot multiplica şi funcţiona prin iniţierea şi controlarea formării produşilor lor genetici, adică a unor proteine specifice. Probabilitatea cu care un fragment de ADN străin îşi poate manifesta funcţia genetică în microbul respectiv este de 1 la 800 000. Totuşi prin alegerea corespunzătoare a microbilor potriviţi pentru a accepta, a multiplica şi a pune în funcţiune o genă străină se pot obţine culturi (clone) microbiene omogene, alcătuite din microbi cu proprietatea identică de a sintetiza produsul genetic străin.

Metodologia clonării genetice cuprinde următoarele trei faze:

a) Obţinerea porţiunii ADN recombinate. Fragmentele ADN extrase din

cromozomi se scindează cu ajutorul enzimelor restrictive. Produşii de scindare se fracţionează electroforetic în gel de acrilamidă, apoi fracţiunile active alese se cuplează cu un vector potrivit speciei microbiene corespunzătoare (bacteriofag, fagul-).

b) Introducerea în microbul gazdă a vectorului purtător de ADN; vectorul pătrunde în mod spontan în interiorul microbului, împreună cu porţiunea funcţională de ADN vehiculată.

c) Selecţionarea şi proliferarea prin inoculări succesive a microbilor individuali purtători de fragmente de ADN recombinate. Aceasta poate fi facilitată de faptul că unii vectori (plasmide, factori de rezistenţă) iniţiază manifestarea în microbi a rezistenţei împotriva unor antibiotice. Astfel, antibioticul respectiv adăugat la colonii va distruge toţi microbii cu excepţia celor deveniţi rezistenţi, purtători de vector şi de ADN exogen. Aceşti microbi îşi păstrează capacitatea de a reproduce o genă introdusă şi de a o menţine în stare funcţională. Coloniile acestor microbi pot fi folosite pentru obţinerea la scară industrială a unor proteine biologic active, ca diferiţi hormoni proteici (insulina, ACTH, STH etc.), interleukine (IL_{1-16}), interferoni.

4.5.4. Mecanismul de reparare a erorilor genetice

Mecanismul complicat şi multifactorial al transmiterii informaţiilor genetice prezintă multiple posibilităţi de eroare. Modificările spontane apărute la niveluri diferite ale materialului genetic numite unităţi, duc în fiecare caz la manifestarea unor caractere morfologice şi funcţionale noi, uneori chiar incompatibile cu viaţa. După Miroslav Radman şi Robert Wagner, textul informaţiilor genetice umane conţine în total 3 bilioane de litere. Genomul unei celule germinative umane conţine circa un miliard de nucleotide. Aceasta corespunde unui număr de 300 de milioane de codoni, respectiv 300-400 000 de gene deosebite. Dacă transcrierea acestui text ar prezenta câte o greşeală de tipar din milion în milion de litere, în cursul fiecărei replicaţii a genomului trebuie să apară minim 3000 de greşeli. Din momentul fecundaţiei ovocitului, celulele derivate din zigot se divid de circa un trilion (10^{18}) de ori. Faptul că în cursul acestor diviziuni frecvenţa apariţiei reale a mutaţiilor posibile rămâne cu mult în urma probabilităţii, demonstrează existenţa mecanismelor prin care vieţuitoarele pot aprecia erorile făcute în cursul replicărilor, chiar şi înaintea manifestării lor.

Pentru repararea greşelilor apărute în cursul transcrierilor de ADN/ADN, respectiv de ADN/ARN, au fost descoperite până în prezent trei mecanisme. Primul mecanism supraveghează alegerea în cursul replicaţiei, conform codului genetic, a bazelor purinice şi pirimidinice. Al doilea mecanism controlează secvenţa bazelor deja cuplate. În cazul în care o bază în poziţia terminală din secvenţa nou-sintetizată nu se potriveşte codului corect, baza nepotrivită este îndepărtată din spirală de către o enzimă endonucleaza şi este înlocuită cu baza adevărată sub acţiunea unei enzime ADN-polimeraza. În sfârşit, al treilea mecanism al corectării, constă în descoperirea şi

corectarea acestor greşeli ale transcripţiei, care au scăpat cumva de controalele anterioare.

Din unele mutante ale bacilului Coli (Mut H, Mut L, Mut S) au fost izolate proteine care se pot fixa pe secvenţele greşite ale ADN (Mut L, Mut S) sau prezintă o acţiune enzimatică ADN-azică (Mut H). Secvenţa corectă a semispiralei lezate se reface de către o enzimă ADN-polimeraza, folôsind drept mostră secvenţa semispiralei originale. În cursul corectării cele două capete ale semispiralei în reparaţie se ţin îndepărtate de către o altă proteină (Mut U). Semispirala folosită ca mostră este stabilizată temporar de o proteină fixatoare a semispiralei (*Single Strand Binding Protein. SSBP*). În sfârşit, porţiunea de ADN cu secvenţa bazelor restabilită în mod corect se reintroduce în semispirala deschisă şi se fixează la ambele capete ale acesteia de către o enzimă numită ADN-ligaza. Prin aceasta se restabileşte şi structura dublu spiralată a ADN. Exactitatea extraordinar de mare a transcripţiei este asigurată prin specificitatea extrem de mare a ADN-polimerazelor.

4.5.5. Legile lui Gregor Mendel

Constatările proprii făcute referitor la transmiterea ereditară a unor proprietăţi la plante au fost formulate, în anul 1865, de reverendul Gregor Mendel. Încrucişând mazărea verde cu cea galbenă a observat că prima filiaţie (F_1) este alcătuită exclusiv din urmaşii cu mazăre galbenă. Membrii filiaţiei a doua (F_2) crescută din semenii celei dintâi au prezentat o separare a proprietăţilor galben şi verde, într-o proporţie de 3:1. În cadrul filiaţiei a treia (F_3) din fiecare semen purtător de proprietate (culoare) individuală au crescut descendenţi de aceiaşi culoare: galben din galben, verde din verde.

Pentru a explica acest mod ordonat al transmiterii ereditare a unor semne caracteristice ale unei specii, Mendel a presupus că fiecare semn caracteristic este determinat de către un factor genetic dublu (cu terminologia actuală, pereche de alele). Aceşti factori (cu terminologia actuală: genele) provin în egală măsură din ambii părinţi şi pot fi dominanţi sau recesivi. La homozigoţi ambii factori îşi manifestă proprietăţile în întregime. La heterozigoţi, însă, factorii dominanţi suprimă factorii recesivi şi îşi manifestă singuri caracterele. Combinările heterozigotice ale alelelor sunt însă numai temporare şi se limitează pe perioada vieţii individului. Cu ocazia filiaţiei următoare, ele se separă şi se recombină din nou. Pe baza celor expuse, legile eredităţii formulate de Mendel pot fi sintetizate în felul următor (figura 69).

1. Principiul uniformităţii: în fiecare membru al filiaţiei (F_1) se manifestă în mod exclusiv proprietăţile alelei dominante.

2. Principiul scindării (segregării): la membrii filiaţiei a doua (F_2) izolarea într-un raport de 3:1 a proprietăţilor dominante şi recesive (25% homozigot dominant, 50% heterozigot dominant şi 25% homozigot recesiv).

3. Principiul distribuţiei independente a markerilor: începând cu filiaţia a treia (F_3) proprietăţile alelomorfe dominante şi recesive se manifestă separat şi independent.

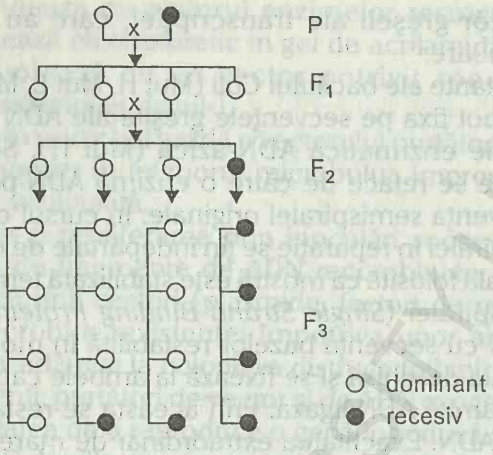


Fig. 69. Manifestarea legilor lui Mendel în cursul filiaţiilor succesive.

4.5.6. Garnitura cromozomială a celulelor somatice: cariograma

În cursul diviziunii celulelor somatice, în metafază, cromatina nucleară se condensează formând câte o pereche din fiecare cromozom (diploidie). Colchicina, adăugată la culturile celulelor, opreşte mitoza tocmai în metafază. Folosind această acţiune, Joe Hiu Tijo şi Johan Albert Levan au reuşit, în 1956, să obţină şi să înregistreze idiogramele cromozomilor umani. S-a constatat că celulele diploide umane conţin 44 de cromozomi, dintre care 22 sunt perechi omoloage şi o pereche, a cromozomilor sexuali X (feminin) şi Y (masculin), determină sexul indivizilor XX la femei şi XY la bărbaţi.

Conform convenţiei încheiate la Denver (1960), cromozomii se clasifică pe baza dimensiunilor, formelor, situaţiei părţii centrale (centromerului), aspectul braţelor şi sateliţilor. Cariograma înseamnă aşezarea secvenţială realizată în ordinea descreşterii mărimilor celor 22+2 feluri de cromozomi umani (figura 70).

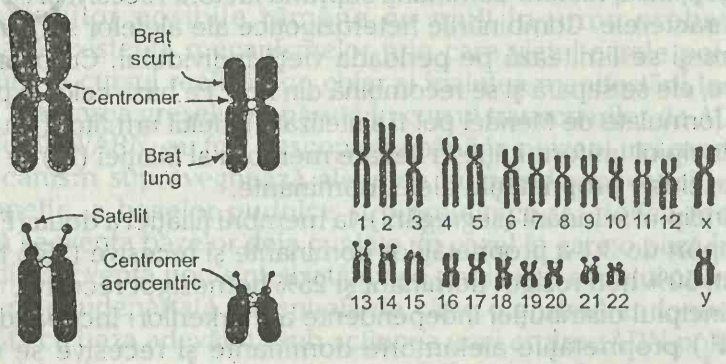


Fig. 70. Principiile de clasificare a cromozomilor şi schema unei cariograme.

Cromatina din cromozomii sexuali poate fi apreciată şi prin studierea corpusculilor lui Barr, prezenţi în nucleul celulelor epiteliale dar şi al granulocitelor, corespunzând existenţei celor doi cromozomi XX la femei. Pe imaginile microscopice ale cromozomilor, cu ajutorul unor tehnici histochimice speciale, pot fi identificate striaţii caracteristice bine corelabile cu hărţile genetice obţinute prin cartografie. Cu ajutorul efectuării cartogramelor s-a reuşit şi identificarea unui număr însemnat de anomalii cromozomiale. Astfel, s-a constatat că celulele somatice ale bolnavilor cu mongolism (boala Down), descrisă încă din anul 1865, conţin cromozomul nr. 21 în triplu exemplar, fiind vorba de o trisomie (Jerome J.L.M. Lejeune, 1959). A fost descrisă şi trisomia cromozomilor nr. 13 (Emile Patan, 1960) şi 18 (John Edwards, 1960).

În cursul metafazei se pot manifesta tulburări ale cromozomilor ca: nedespărţiri, fragmentări, translocări etc. Fragmentarea cromozomului nr. 5 a fost descrisă de Jerome J.L.M. Lejeune la sugarii cu tulburări nervoase grave şi cu un plâns caracteristic (*cri du chat*). La bolnavii cu leucemie mieloidă cronică apar translocări la cromozomul nr. 21 sau/şi la nr. 22. Fenomenul a fost descris, în 1960, de John Nowell şi Francis Hunerford în Philadelphia şi din acest motiv aceşti cromozomi sunt desemnaţi cu Ph. Infecţia cu virusul Epstein-Barr (VEB) în regiunile cu climat continental, prin invadarea limfocitelor B, produce o boală relativ uşoară, mononucleoza infecţioasă. În regiunile tropicale, însă, infecţia copiilor cu VEB duce la malignizarea ţesutului limfatic sub forma limfomului descris de Burkitt. S-a constatat că sub acţiunea VEB, în limfocitele B infectate se produce translocarea unei porţiuni a cromozomului nr. 8 care conţine sub formă inactivă o oncogenă numită c-myc, la braţul scurt al cromozomului nr. 14. Porţiunea translocată se fixează în apropierea genelor active, reglatoare a biosintezei lanţurilor grele ale imunoglobulinelor. Sub acţiunea indirectă a acestor gene, c-myc se activează, se transcrie în ARNm şi iniţiază biosinteza în citoplasmă unui produs proteic. Această proteină, purtătoare de semnal, părăseşte limfocitele şi declanşează transformarea malignă a ţesutului limfatic.

Dintre anomaliile numerice ale sex-cromozomilor, sindromul Klinefelter apare la bărbaţi. Deşi pe baza fenotipului aceste persoane sunt masculine, celulele lor somatice dispun de un număr neobişnuit de cromozomi X, formând cupluri XXYsau XXXY. Lipsa cromozomilor X la femei (monosomie X=XO) duce la manifestarea unei disgeneze gonadice, numită sindromul Turner. La aceste femei lipsesc şi granulele sex-cromatinei şi ale granulocitelor.

Frecvenţa la om a apariţiei anomaliilor cromozomiale asociate şi cu manifestarea unor boli ereditare este de circa 0,5%, cu predominanţa anomaliilor numerice şi structural-funcţionale ale sex-cromozomilor.

4.5.7. Erorile înnăscute ale metabolismului

Noţiunea de erori înnăscute ale metabolismului (*inborn errors of metabolism*) a fost introdusă în medicină, în anul 1908, de Archibald Edward Garrod. El a studiat manifestarea legilor lui Mendel la membrii familiilor cu

incidenţa mare a unor boli ereditare, cunoscute încă din vremea lui: alcaptonuria, albinismul, cistinuria şi pentozuria. Pe baza naturii tulburărilor metabolice şi a transmiterii autosomal-recesive a acestor boli, Garrod a presupus că manifestarea simptomelor acestora este cauzată de absenţa unor factori necesari (enzime) pentru desfăşurarea normală a metabolismului. În cazul unor factori recesivi, lipsa lor se transmite de-a lungul generaţiilor în mod latent (heterozigotic), manifestându-se numai la omozigoţii cu ambele alele deficitare sau cu absenţa acestora. Concepţia lui Garrod a fost confirmată mult mai târziu, în anul 1942, de George Wells Beadle şi Edward Lawrie Tatum, care au formulat postulatul: o genă, o enzimă şi de Linus Pauling, în 1952 (laureat cu premiul Nobel pentru chimie). Acesta a lansat noţiunea de boli moleculare, pe baza descoperirii rolului cauzal al mutaţiilor genelor care controlează biosinteza moleculelor de globină.

Pionerii adevăraţi ai cercetărilor genetice moderne, Thomas Hunt Morgan şi August Weissmann au descoperit şi au cartografiat, cu ajutorul unor metode simple, existenţa şi funcţiile genelor repartizate linear de-a lungul cromozomilor, cu mult în urma cunoaşterii ADN. De atunci nu numai că s-a reuşit identificarea şi localizarea majorităţii genelor din genomul uman, dar a crescut la peste o mie numărul diferitelor erori înnăscute uni- sau polifactoriale ale metabolismului. Dintre acestea, 947 de boli se moştenesc în mod autosomal recesiv şi 171 sunt transmise de cromozomul X.

În ciuda acestor date abundente, numai în circa 20% de cazuri se cunosc cu exactitate cauzele şi natura dereglărilor enzimatice în erorile înnăscute ale metabolismului. Totuşi, cunoaşterea din ce în ce mai bine a patomecanismului acestor boli ereditare, contribuie nu numai la identificarea lor mai sigură, dar şi la prevenirea şi în unele cazuri chiar la repararea lor. Archibald E. Garrod a explicat mecanismul manifestării erorilor înnăscute ale metabolismului în felul prezentat în figura 71.

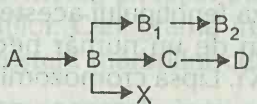


Fig. 71. Mecanismul manifestării enzimopatiilor ereditare.

Funcţionarea normală a unui lanţ de transformări metabolice, alcătuit din mai multe faze (A, B şi C), este condiţionată de prezenţa şi activitatea enzimelor specifice. În cazul lipsei sau nefuncţionării unei enzime, substratul acesteia se acumulează din cauza consumului absent sau insuficient. Prezenţa în exces a substratului poate să aibă efecte nocive în mod direct; acesta poate fi transformat ocazional într-un produs patologic (X) sau poate fi dirijat spre alte transformări succesive (B_1, B_2 etc.). Deşi produsele în exces pot să fie excretate, în majoritatea cazurilor rămân depozitate totuşi în celule şi duc la manifestarea aşa-ziselor boli prin acumulare (tezaurismoze).

Pe baza formelor clinice, enzimopatiile ereditare pot fi clasificate în următoarele trei grupe:

a) Boli prin acumulare (tezaurismoze), care se manifestă din cauza lipsei congenitale a unor enzime specifice, în care produşii patologici în exces rămân depozitaţi în celule.

b) Boli ereditare toxice, în care produsul patologic toxic se elimină din celule în sânge, este transportat la toate organele şi ţesuturile, dintre care unele pot fi deosebit de sensibile la acesta (creierul, ficatul, muşchii, ochiul, ţesutul conjunctiv etc.). Fiind excretaţi şi în urină, aceşti produşi patologici pot fi depistaţi uşor chiar imediat după naştere. În felul acesta, avem posibilitatea prevenirii manifestării efectelor lor dăunătoare, ca în cazul fenilcetonuriei. Sunt de remarcat consecinţele distrugătoare ale acestei enzimopatii (lipsa fenilalaninhidroxilazei) asupra neuronilor. În cursul vieţii intrauterine a fătului aceste consecinţe nu se pot manifesta, deoarece celulele placentei mamei asigură metabolizarea normală a fenilalaninei.

c) În unele cazuri, absenţa ereditară a unor enzime se manifestă prin lipsa biosintezei sau descompunerea unor mediatori neurotransmiţători. La sugarii care prezintă starea spastică dependentă la vitamina B_6 este scăzută sau absentă producerea mediatorului inhibitor al neuronilor, acidul gama-amino-butiric (GABA). La sugarii cu encefalopatie glicinică ereditară se acumulează în neuroni glicina, care la nivel presinaptic inhibă transmiterea impulsurilor nervoase spre fibrele musculare. Din această cauză scade puternic tonusul muscular, în special cel al muşchilor respiratori. Pe plan simptomatic, tonusul muşchilor poate fi crescut prin administrarea de stricnină, care acţionează tot la nivel presinaptic.

Din punct de vedere al patomecanismului, enzimopatiile ereditare se pot dezvolta prin două mecanisme deosebite: alelice şi nealelice.

a) Mecanismul alelic se manifestă în urma mutaţiei aceloraşi perechi de alele, cuplate cu aceeaşi enzimă, sau acelaşi complex enzimatic. În unele cazuri, alelele unei perechi nici nu se schimbă; mutaţia se manifestă la nivelul alelelor unor factori reglatori (cofactori) ai fazei metabolice atinse. Cazurile deosebite ale acestui mecanism sunt: formarea hemoglobinei S în anemia drepanocitară, lipsa enzimei glucozo-6-fosfat dehidrogenaza în hematiile bolnavilor cu anemie hemolitică ereditară, variaţiile alotipice ale unor proteine plasmatice şi a unor clase de imunoglobuline etc.

b) La baza mecanismului nealelic al dezvoltării enzimopatiilor ereditare stau mutaţii care, deşi se manifestă la nivelul alelelor diferite influenţează totuşi într-o măsură practic egală transformările catalizate de enzimele respective. Prin aceste mecanisme se manifestă unele endocrinopatii ereditare şi unele sfingolipidoze.

Depistarea prenatală a bolilor ereditare

Enzimopatiile ereditare se manifestă la embrioni chiar din faza cea mai precoce a vieţii lor intrauterine. Totuşi din cauza funcţiilor compensatorii ale celulelor placentei, în majoritatea cazurilor, consecinţele lor dăunătoare se manifestă într-o măsură mult mai redusă în organismul feţilor. După

naştere însă, prin descoperirea rapidă a enzimopatiei şi eliminării din alimentaţia sugarilor a precursorilor toxici, devine posibilă prevenirea manifestărilor toxice. În celelalte cazuri, leziunea enzimatică nu poate fi compensată nici înainte, nici după naştere; ca urmare aceşti feţi purtători de malformaţii congenitale sunt irecuperabili atât pe plan structural, cât şi funcţional.

Din perioada embriogenezei, printr-o amniocenteză efectuată în condiţii sterile, se poate obţine lichid amniotic de la gravide, fără vreun risc pentru mamă sau făt. Cu ajutorul analizei biochimice şi patologice a lichidului poate fi identificat un număr însemnat de enzimopatii şi alte anomalii ereditare, ca unele tezaurismoze gangliozidice, leucodistrofia metacromazică, spina bifidă etc.

4.5.8. Materialul genetic al citoplasmei

Este de mult cunoscut în botanică faptul că transmiterea ereditară a unor markeri, ca striaţiile albe ale unor frunze verzi, nu urmăresc legile mendeliene. Boris Eprussi a observat, în anul 1949, că biosinteza unor enzime din lanţul respirator al levurilor nu este dirijată de genele localizate în nuclei, ci de unele structuri ADN din citoplasma lor. S-a constatat pe de-o parte că purtătorii acestor structuri extracelulare sunt cloroplastele frunzelor verzi, respectiv mitocondriile celulelor eucariote, pe de altă parte structura acestora se deosebeşte esenţial de cea a ADN-ului din nucleu.

ADN extras din mitocondrii este o spirală dublă, închisă la ambele capete sub forma unui cerc, în mod similar cu structura ADN de la procariote. Dimensiunile moleculelor de ADN mitocondrial sunt substanţial mai mici (conţinând 16 659 nucleotide pe particulă) şi seamănă astfel mai mult cu genomul unor virusuri. Este de remarcat faptul că genele mitocondriale codifică numai biosinteza citoplasmatică a unui număr restrâns de proteine şi enzime mitocondriale. Majoritatea acestora, dar şi a factorilor necesari pentru transcripţia mitocondrială a ADN în ARNm sunt dirijate tot de gene localizate în nucleu.

Spre deosebire de ADN nuclear, în care secvenţele exonilor transcriptibili sunt întrerupte de secvenţe de intrioni inactivi, structura ADN mitocondrial practic nu conţine intrioni. S-a constatat că genomul mitocondrial uman conţine în total 37 de gene individuale, dintre care două codifică două molecule de ARNr, încă 22 de gene controlează formarea a 22 de feluri specifice de ARNt, 5 gene comandă biosinteza a 5 enzime mitocondriale diferite, iar produsele proteice ale celor 8 gene rămase nu au fost încă identificate.

Este deosebit şi mecanismul transcrierii mitocondriale a ADN (ARNm). Spre deosebire de mecanismul nuclear, în mitocondrie este un singur promotor. Produsul macromolecular ARN al acestei transcripţii se fragmentează ulterior pe cale enzimatică. În sfârşit, spre deosebire de ARNm transcris în

nucleu, capabil să recunoască 61 de feluri diferite de ARNt, ARNm mitocondrial codifică numai 22 de feluri diferite de ARNt, totuşi este capabil să citească toţi 61 de codoni posibili. S-a constatat că la baza acestui fenomen stă faptul că fiecare dintre cele 22 de feluri deosebit de ARNt codificate de ADN mitocondrial poate citi 2-4 codoni sinonimi. De exemplu, în cazul anticodonului G:U, guanina poate să se cupleze atât cu adenina, cât şi cu citozina, respectiv uracilul cu guanina sau cu adenina.

În aceste cazuri, codul genetic universal nu funcţionează ca triplet, ci ca duet. Astfel, Piet Borst este de părere că mitocondriile eucariotelor (dar şi cloroplastele frunzelor verzi) reprezintă o formă ancestrală a unor plasmide din perioada începutului vieţii pe Pământ, care a intrat în endosimbioză cu un microb primitiv, dar care şi-a păstrat parţial informaţiile genetice proprii în tot cursul filogenezei.

Gena egoistă

După Richard Dawkins (1976) unitatea morfofuncţională de bază a selecţiei naturale nu o constituie nici specia, nici populaţia sau individul solitar, ci gena însăşi. Aceşti replicatori, formaţi în cursul perioadelor incipiente ale apariţiei vieţii pe Pământ capabile de autoreproducere, înaintând continuu pe treptele evoluţiei, au creat pentru această autoreproducere aparate din ce în ce mai complicate şi perfecţionate. Dawkins numeşte aceste aparate „maşini supravieţuitoare", a căror structuri mai mult sau mai puţin complicate corespund gradului de dezvoltare a diferitelor vieţuitoare. Astfel, indiferent de interesele individuale şi manifestarea întâmplătoare sau voluntară a acestora, toate fenomenele care au loc într-o asemenea „maşină supravieţuitoare" servesc într-o manieră egoistă şi exclusivă la păstrarea şi transmiterea continuă şi nemodificată a informaţiilor genetice.

În unele cazuri deosebite şi la animalele superioare, programele determinate genetic şi ordonate pe plan cibernetic se pot manifesta la nivelurile cele mai superioare ale comportării, sub forma unor activităţi complicate şi coordonate, dar totuşi automatice. În mod analog transformările larvelor în insecte sau a embrionilor de broască în amfibii mature, sub acţiunea unor hormoni (ecdisonul, respectiv tiroxina), şi comportamentele manifestate sub acţiunea hormonilor sexuali secretaţi periodic, ca: dansul de nuntă, construirea cuiburilor, îngrijirea puilor etc., în ciuda complexităţii lor sunt nişte mişcări involuntare şi forţate, declanşate şi coordonate de programe determinate genetic.

Faţă de acest comportament automat, apariţia creierului şi gândirii umane a însemnat în cursul evoluţiei o modificare într-adevăr revoluţionară, care a făcut înălţarea omului mult deasupra regnului animal. După Dawkins această înălţare se datorează culturii umane, deoarece ceea ce este excepţional la om, poate fi sintetizat într-un singur cuvânt: cultura. Ca urmare, supa ancestrală a genelor din zorile vieţii, a fost transformată în supa culturii umane, dând naştere la replicatorii elementari ai gândirii, numiţi meme. În comparaţie cu genele, evoluţia acestor meme este mult mai rapidă şi mult

mai puţin conservatoare. În consecinţă, deşi am fost construiţi şi educaţi ca nişte maşini genetice, între timp am devenit totuşi suficient de puternici să ne opunem creatorilor noştri. Noi oamenii, singuri pe Pământ, putem să ne opunem tiraniei oarbe a replicatorilor.

4.5.9. Genele dezlănțuite; virusurile

Atât organismele procariote, cât şi cele eucariote funcţionează ca sisteme vii, deschise, autoreglabile, care eliberează, depozitează şi utilizează ele însele energia necesară pentru formarea şi funcţionarea biostructurilor proprii. Sistemul de comandă şi de control al acestor funcţii complexe este localizat în materialul genetic al celulelor.

Spre deosebire de acestea, virusurile sunt particule mici, invizibile cu microscopul obişnuit, care se situează la limita substanţelor anorganice şi organice. Se aseamănă cu substanţele anorganice prin faptul că menţinerea structurilor lor nu are nevoie de nici un aport energetic. Pot fi comparate şi cu vieţuitoarele, deoarece sub formă de ADN şi ARN, în anumite condiţii (folosind elementele funcţionale ale celulelor gazdă), comandă reproducerea şi multiplicarea lor, numită replicare virală. Ca urmare, virusurile sunt în mod obligatoriu paraziţi, deoarece existenţa lor şi multiplicarea este condiţionată de pătrunderea lor în celulele gazdă.

În ciuda faptului că multe virusuri cauzează boli contagioase (pojar, poliomielită, hepatite, gripă, varicelă etc.), altele sunt chiar oncogene pentru om, nu toate virusurile pot fi considerate patogene. Este însă de remarcat faptul că în comparaţie cu numărul extrem de mare al diferitelor antibiotice cu efecte antimicrobiene, numărul medicamentelor cu acţiune antivirală sigură este foarte mic, printre altele, inhibitorul enzimei timidin-kinaza numit Aciclovir (Zovirax, Virulex) sintetizat împotriva virusurilor din familia Herpesului de Gertrude Elion, şi azidotimidina (AZT), inhibitorul replicaţiei HIV, obţinut de George Hitchings (amândoi laureaţi cu premiul Nobel pentru medicină în anul 1988, împreună cu cel de al treilea cercetător, Sir James Black, realizatorul sintezei ß-blocanţilor).

Edward Jauner a efectuat prima vaccinare antivirală încă din anul 1796, dar existenţa agenţilor patogeni invizibili a fost presupusă cu un secol mai târziu de către Louis Pasteur. Cu toate insuccesele privind izolarea şi identificarea agentului patogen al rabiei, Pasteur a reuşit prepararea primului vaccin eficace împotriva acestei boli (1885). Primul virus patogen în regnul vegetal, virusul mozaicului tutunului, a fost descris şi pus în evidenţă în extractele vii, contaminante ale frunzelor, de către Michael Beijerinck, în 1898. Denumirea de virus înseamnă otravă şi a fost propusă şi acceptată pe baza consecinţelor fatale ale infecţiei virale ale celulelor. Prima boală exclusiv umană, cauzată de virus, descrisă în 1901 de James Caroll şi Walter Reed a fost febra galbenă.

Salvador E. Luria consideră vie fiecare structură care dispune de un program genetic propriu, capabil să producă urmaşi cu structuri şi funcţii similare. Conform acestei afirmaţii virusurile pot fi considerate organismele vii cele mai simple, deşi se pot multiplica numai prin concursul microorganelor celulelor gazdă. Ca urmare, virusurile sunt vii în măsura în care pot fi considerate vii şi genele din nucleii celulelor. Cu excepţia ADN mitocondrial, genele genomului, inclusiv elementele mobile, nu părăsesc în nici un caz nucleul, nici celula. În contrast, virusurile pătrund în celulele gazdă din exterior, se multiplică în ele ca genele, după care părăsesc celulele din nou, în majoritatea cazurilor prin distrugerea lor litică (ciclul litic). Pe baza acestor date virusurile pot fi considerate într-adevăr gene dezlănţuite.

Structura particulelor virale individuale (numite virioni) este realizată prin asamblarea spontană, dar pe baza unor simetrii geometrice exclusive ale componentelor structurale produse separat în cursul replicaţiei (figura 72).

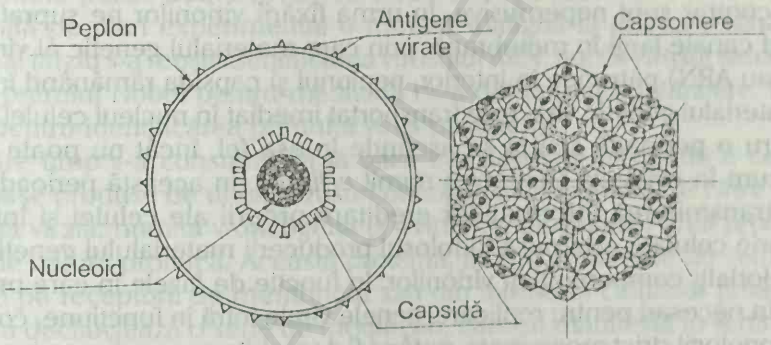


Fig. 72. Structura moleculară a virionilor din familia Herpes-virusurilor.

Virionul este înconjurat la exterior de un înveliş numit peplon, cu o structură lipidică foarte asemănătoare cu membrana celulară. Sub acest peplon se găseşte un al doilea înveliş proteinic numit capsidă sau nucleocapsidă, formată prin asamblarea numeroşilor monomeri (capsomere). În miezul virionului este localizat, sub o formă înconjurată de capsidă, materialul genetic infecţios format din ADN sau ARN, dar în nici un caz de ambele structuri. Numărul genelor prezente într-un virion poate varia între câteva gene (genomul bacteriofagului QB conţine numai 4 gene) şi câteva sute de gene (cel al poxvirusurilor este alcătuit din 250 de gene). Masa moleculară a virionilor poate varia între câteva sute de mii şi câteva sute de milioane daltoni. Masa moleculară a unor virusuri vegetale (viroizi) care conţine numai 3-4 gene, este atât de redusă, încât particulele lor nu au nici capsidă. Un asemenea viroid (*Potato Spindle Tuber Viroid, PSTV*) produce boala tuberofusiformă a roşiilor.

Genele cuprinse în virioni codifică atât multiplicarea acizilor nucleici (ADN sau ARN) infecţioşi, cât şi producerea proteinelor virale specifice (capsomeri, enzime). La prima vedere, cantitatea materialului genetic

prezent într-un virion pare să fie uneori prea redusă pentru a codifica producerea unor cantităţi însemnate de produşi necesari asamblării finale. Această aparenţă negativă poate fi uşor explicată cu ajutorul prezentării detaliilor cantitative a virusului mozaicului tutunului (VMT).

Virionul VMT este format dintr-o singură moleculă mono-spiralată de ARN, care conţine 6 400 de nucleotide. Nucleocapsida acestei particule conţine în schimb 340 000 de aminoacizi. Este evident că materialul genetic al virionului nu codifică formarea dintr-o dată a întregii mase proteice, ci numai a unui singur component (capsomer) al acesteia. Capsomerii (în cazul VDM într-un număr de 2120) se asamblează ulterior în jurul nucleului, conform simetriei geometrice restrânse şi unice pentru fiecare specie virală.

Infecţia virală începe cu fixarea virionului pe suprafaţa celulei gazdă. Pentru aceasta este necesară prezenţa în membrană a unor structuri complementare structurilor din peplonul viral (receptori). În cazul în care celulele dispun de aceşti receptori, ele sunt permisive pentru infecţia virală; în caz contrar sunt nepermisive. În urma fixării virionilor pe suprafaţă se deschid canale largi în membrană, prin care materialul genetic al virusului (ADN sau ARN) pătrunde în interior, peplonul şi capsida rămânând în exterior. Materialul genetic viral este transportat imediat în nucleul celulei gazdă şi pentru o perioadă scurtă se ascunde în aşa fel, încât nu poate fi pus nicidecum în evidenţă (fenomen numit *eclipsă*). În această perioadă este oprită transmiterea informaţiilor ereditare proprii ale celulei şi întreaga maşinărie celulară este pusă în folosul producerii materialului genetic viral şi al celorlalţi componenţi ai virionilor. În funcţie de fazele în care produşii lor devin necesari pentru replicare, genele virale intră în funcţiune, conform unei cronologii strict programate, putând fi deosebite gene precoce-imediate, precoce-tardive şi tardive.

Schema replicării intracelulare, sub acţiunea enzimei transcriptaza inversă a retrovirusurilor care conţine ARN, este prezentată în figura 68. O altă variantă a acestei replicări este realizată prin formarea pe baza codului genetic viral a unei enzime numită ARN-replicaza (ARN-sintetaza) care multiplică ARN viral. În cazul retrovirusurilor se deosebesc particulele infecţioase de ARN şi de ARNm, care comandă biosinteza proteinelor virale pe suprafaţa ribozomilor. Pe baza unor convenţii, ARNm de origine virală se desemnează cu (+) ARN, iar cel infecţios cu (-) ARN.

În funcţie de modul transcrierii în ADN şi al multiplicării materialului, virusurile ARN pot fi cuprinse în patru grupe:

Virusurile din prima grupă (de exemplu virusul poliomielitei) conţin o singură spirală formată din (+) ARN. Pătrunse în celulele gazdă produc copii negative (-) ARN, care servesc drept mostre pentru copiile următoare ale (+) ARN.

Virusurile cuprinse în grupa a 2-a (exemplu – virusul turbării) dispun de semispirale (-) ARN, care servesc drept modele pentru formarea (+) ARNm.

Virusurile din grupa a 3-a (exemplu – retrovirusurile) conţin ARN dublu spiralat, în care un (+) ARN comandă biosinteza asimetrică a (+) ARNm.

În grupa a 4-a sunt cuprinse retrovirusurile cu proprietăţile cele mai neobişnuite, ca virusul sarcomului Rous al puilor, virusurile T-limfocitare animale şi umane (HTLV-I şi II) sau virusul imunodeficienţei umane (HIV). În cursul replicării acestora, (+) ARN, de sub acţiunea enzimei transcriptaza inversă, se transcrie întâi în ADN nuclear, care serveşte drept model pentru multiplicarea (+) ARN viral. Este de remarcat că şi secvenţele ARN transcrise în ADN nuclear pot fi cuprinse ca provirusuri temporar inactive, care însă pot fi oricând activate prin de-represiune.

4.5.10. Oncogenele

Prin infectarea puilor sănătoşi cu extractele celulare, obţinute din sarcoamele puilor bolnavi, Peyton Rous a reuşit primul, în anul 1911, să transmită pe plan experimental o tumoră malignă la animale sănătoase. Mult mai târziu s-a reuşit identificarea virusului ARN, numit virusul sarcomului Rous (premiul Nobel pentru medicină i s-a dat cu mare întârziere, în anul 1966, pentru identificarea primului virus oncogen).

Între timp s-a constatat că la baza transformării tumorale a celulelor sănătoase produse de unele virusuri oncogene stă iniţierea de către o genă malignă virală, numită v-oncogena (v=virus), a biosintezei unui produs genetic de natură proteică. Această proteină, fiind o purtătoare de semnal, se fixează pe receptorii de membrană sau din interiorul celulelor ţintă şi prin aceasta declanşează o serie de modificări, care se manifestă în schimbarea substanţială a structurilor şi funcţiilor celulare, caracteristice tumorilor. Transformarea tumorală a celulelor poate fi realizată pe plan experimental atât în *vitro*, cât şi în *vivo*, pe celule sănătoase izolate, în medii de cultură. Grupa cealaltă a virusurilor oncogene nu conţine v-oncogene, transformarea tumorală a celulelor se manifestă numai în *vivo* şi cu multe luni în urma infecţiei. Genomul viral persistă în continuare în celulele infectate.

Gene cu secvenţe de bază similare cu cele ale v-oncogenelor s-au găsit şi în genomul celulelor sănătoase. Aceste gene se numesc c-oncogene (c=celulă), având produşi asemănători cu cei ai v-oncogenelor. Modul de funcţionare al v-oncogenelor poate fi demonstrat prin prezentarea genomului virusului sarcomului lui Rous (VSR) arătat schematic în figura 73.

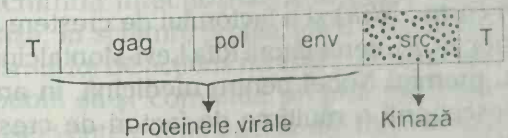


Fig. 73. Structura moleculară a unui virion ARN (retrovirus, virusul sarcomului Rous, VSR).

Genomul VSR este alcătuit din 10 000 de ribonucleotide, care conţin în total 4 gene. La ambele capete ale genomului se găseşte câte o secvenţă lungă (*Long Terminal Repeat LTR*) care se dublează în cursul transcrierii în ADN. Gena denumită gag codifică biosinteza unei proteine cu masa moleculară de 76 000 d., care ulterior se scindează enzimatic în patru fragmente individuale mai mici. Gena denumită pol codifică producerea enzimei transcriptaza inversă, a cărei subunitate are masa moleculară de 65 000 d şi se formează din subunitatea B, prin proteoliză. Gena env. comandă formarea capsomerelor, care se asamblează în capsidă, dar în acelaşi timp facilitează şi ieşirea din celulă a virionilor.

În sfârşit, v-oncogenă numită src (sarcom) nu participă la replicarea virusului. În schimb, produsul ei proteic duce la transformarea malignă a celulelor ţintă.

V-oncogenă src codifică biosinteza unei protein-enzimă (protein-kinază fosforilantă) cu masa moleculară de 60 000 d, care conţine 520 de aminoacizi, desemnată ca pp60v-src (pp=*phosphoprotein*, 60=60 kd, v=virus, src=gena src). Enzima ieşită din celulele infectate intră în contact cu celulele sănătoase, în care acţionează pe de o parte prin fosforilarea grupărilor fenolice ale resturilor de tirozină din proteinele celulare de membrană, iar pe de altă parte, asupra proteinei elastice numită vinculina, din sistemul tubular elastic de susţinere a celulelor. Primul mecanism declanşează transformarea tumorală a celulei, cel de al doilea reduce aderenţa celulelor transformate şi favorizează astfel formarea metastazelor. Protein-kinaze similare se găsesc şi în celulele normale, dar acestea fosforilează grupările alcoolice ale oxi-aminoacizilor (serina, treonina).

Până în prezent s-a reuşit descoperirea unui număr de 17 v-oncogene. A fost într-adevăr surprinzătoare descoperirea lui Russel F. Doolittle, că 16 dintre aceste structuri genetice de origine virală se găsesc şi în genomul uman normal. Dat fiind că aceste structuri genetice provin din perioadele precoce ale filogenezei, au fost denumite proto-oncogene. Aceste gene sunt active şi în celulele sănătoase, dar gradul lor de transcripţie nu depăşeşte în nici un caz o limită de obicei minimă. Produşii lor genetici sunt nişte proteine purtătoare de semnale, care stimulează creşterea acelor celule, care dispun pe suprafaţa lor de receptorii specifici pentru fixarea acestor factori de creştere. Semnalul primar recepţionat de aceşti receptori se transmite în interiorul celulei spre sistemele enzimatice ţintă, prin diferiţi mesageri secunzi.

Pentru descoperirea şi identificarea factorului de creştere a neuronilor (*Neuronal Growth Factor, NGF*) şi a factorului de creştere a epiteliului (*Epithelial Growth Factor, EGF*), cercetătorii Rita Levi-Montalcini şi Stanley Cohan au fost distinşi cu premiul Nobel pentru medicină, în anul 1986. Până în prezent au fost descoperiţi o mulţime de factori de creştere, ca peptidul activator al celulelor conjunctive (*Tissue Cells Activating Peptid, TCAP*), somatomedina-C (SM-C), factorul de creştere derivat din plachete (*Platelet Derived Growth Factor, PDGF*), grupa interleukinelor (Il_{1-16}) etc. Mecanismul de acţiune al unor factori de creştere este prezentat în figura 74.

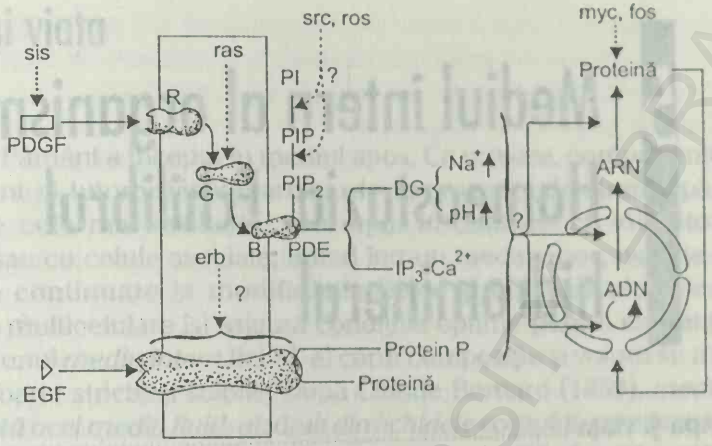


Fig. 74. Mecanismul de acţiune a factorilor de creştere (explicaţia în text).

În unele cazuri, acţiunea oncogenică a ADN-virusurilor, inclusiv a celor din familia *Herpesviridae*, se manifestă prin pierderea parţială a materialului lor genetic şi transformarea în virusuri defective. Porţiunea pierdută a genomului înseamnă, în majoritatea cazurilor, pierderea genelor care codifică biosinteza capsidei. Ca urmare, din cauza lipsei învelişului exterior, virionii deficitari nu pot ieşi din celule. Ca virusuri lente (*slow viruses*) pot duce la manifestarea unor boli degenerative, cu progresare lentă, inclusiv la transformarea tumorală a celulelor gazdă.

Proteinele infecţioase, lipsite de acizi nucleici: prionii

Recent s-a semnalat existenţa unor agenţi patogeni proteici, numiţi prioni (*Proteinaceous Infections Particle, Prio Proteins, PrP*), care nu numai că sunt mult mai mici decât virionii plantelor, dar şi lipsiţi de vreun material genetic. Prima boală numită scrapie, cauzată de prioni, în urma unei perioade lungi de latenţă, a fost descrisă la oi şi capre, de Richard Chandler, în 1935. A doua, numită boala Creuzfeld-Jacob, apare la om şi se manifestă printr-o demenţă progresivă letală.

Particulele prionilor pot fi extrase din neuronii animalelor sau oamenilor bolnavi. Pe imaginile electronooptice, aceste mici particule se prezintă sub forma unor fibrile cu diametrul între 10-20 nm (100-200Å) şi cu lungimea de 100-200 nm (1000-2000Å). Aceste agregate moleculare sunt alcătuite din circa 100 de molecule glucoproteice mai mici, cu masele moleculare între 27-30 000 d. Infecţiozitatea lor nu este condiţionată de prezenţa ARN sau ADN. Ca urmare, nu-şi schimbă infecţiozitatea în urma tratării lor cu ribo- sau dezoxiribonucleaza. În schimb, protează le îi inactivează rapid.

Deşi mecanismul lor de acţiune nu este încă bine cunoscut, se presupune că PrP sunt capabili să-şi comande propria lor biosinteză pe suprafaţa ribozomilor, sau secvenţele aminoacide ale micilor subunităţi peptidice să fie transcrise în ADN.

Ipoteza cea mai probabilă, pare să fie aceea care consideră că PrP acţionează ca peptide semnal, care pătrunzând în celulă declanşează activarea unei protooncogene latente, al cărei produs genetic este PrP însăşi.

5 Mediul intern al organismului. Homeostazia. Echilibrul hidromineral

5.1. Apa şi viaţa 263
5.2. Sângele 267
5.2.1. Volumul şi osmolaritatea plasmei 267
5.2.2. Izoosmoza şi izoionia 269
5.2.3. Lichidul tisular 270
5.2.4. Schimburile hidrodinamice şi difuziunea 270
5.2.5. Biopotenţialul de membrană 272
5.2.6. Izoosmoza şi izovolemia 274
5.3. Echilibrul acido-bazic 276
5.3.1. Concentraţia ionilor de hidrogen, noţiunea de pH 277
5.3.2. Stabilizarea acidităţii soluţiilor: sistemele tampon 278
5.3.3. Stabilirea valorii pH a unei soluţii tampon 279
5.3.4. Mecanismul pulmonar al reglării echilibrului acido-bazic 281
5.3.5. Mecanismul metabolic al regenerării bicarbonaţilor consumaţi 281
5.3.6. Tulburările echilibrului acido-bazic 282
5.3.7. Aciditatea şi osmoza 285
5.3.8. Pierderile de sare şi echilibrul acido-bazic 285
5.3.9. Potasemia şi echilibrul acido-bazic 286
5.4. Plasma sanguină 286
5.4.1. Volumul plasmatic, osmoza, conţinutul mineral 286
5.4.2. Oligoelementele din plasma sanguină: fierul, cuprul, zincul, cobaltul, manganul 290
5.4.3. Proteinele plasmatice 299
5.4.4. Glicoproteinele plasmatice 314
5.4.5. Lipoproteinele plasmatice 316
5.4.6. Imunoglobulinele din plasmă 325
5.4.7. Enzimele din plasmă 328
5.4.8. Hemostaza şi coagularea 359
5.5. Elementele figurate ale sângelui: hematopoieza normală şi patologică 385
5.5.1. Eritrocitele şi hemoglobina 385
5.5.2. Grupele sanguine 393
5.5.3. Leucocitele 399

5.1. Apa și viața

Viaţa pe Pământ a început în mediul apos. Ca urmare, componentul cel mai important al tuturor vieţuitoarelor, de la procariotele simple până la organismele cele mai evoluate, este apa. În contrast cu vieţuitoarele unicelulare sau cu celule asociate, trăind într-un mediu apos, nevoite să se adapteze în continuare la modificările fizice şi chimice ale acestuia, organismele multicelulare îşi asigură condiţiile optime pentru existenţa lor, prin crearea unui *mediu intern* lichid, al cărui compoziţie şi volum se menţin între limite foarte stricte şi stabile. După Claude Bernard (1859), *mediul intern reprezintă acel mediu fluid, alcătuit din lichidele corpului, care înconjoară toate ţesuturile şi a cărui constantă înseamnă condiţia fundamentală şi primară a vieţii.* La vieţuitoarele mai simple acest mediu intern este alcătuit din *hemolimfă*, iar la animalele superioare din *sânge, lichid interstiţial, limfă şi lichid cefalorahidian.*

Conţinutul în apă a vieţuitoarelor scade paralel cu înaintarea lor pe scara evoluţiei. Organismele unicelulare conţin 98% apă, conţinutul în apă al embrionului uman scade treptat în cursul vieţii intrauterine, de la 95% la 85%. La naştere, nou-născutul are un conţinut de apă între 82-72%, care la omul adult, paralel cu înaintarea vârstei, scade până la 70-60%.

Compartimentele de apă ale organismului

Conţinutul total de 70% al organismului (*Total Body Water = TBW*) este repartizat în diferite *compartimente de apă*, delimitate prin membrane biologice lipidice. Trei sferturi (50%, 350-450 ml/kg) din această cantitate se află în celule, formând *compartimentul intracelular* (*IntraCellular Fluid Volume = ICFV*). În cadrul acestui compartiment pot fi deosebite şi spaţiile de apă din interiorul microorganelor celulare (ergastoplasma, lizozomii, mitocondriile, nucleul). Partea rămasă a apei (20%, 150-250 ml/kg) formează *compartimentul extracelular* (*ExtraCellular Fluid Volume = ECFV*).

La rândul său, compartimentul extracelular se împarte în două subfracţiuni: *compartimentul interstiţial* sau *intercelular* (15%, *InterCellular Fluid Volume = ICFV*) şi *compartimentul intravascular* sau *volumul sanguin fluid* (5%, *IntraVascular Fluid Volume = IVFF* sau *Blood Flow Volume = BFV*). Din denumirea acestui compartiment reiese că apa prezentă în circulaţie influenţează în mod substanţial şi volemia, adică dimensiunile volumului plasmatic.

Prezenţa peste tot a apei în organismele vii, precum şi participarea sa la toate fenomenele vieţii, poate fi explicată prin următoarele proprietăţi:

a) Prin caracterul său dipolic reprezintă un mediu ideal, atât pentru dizolvarea substanţelor polare neelectrolitice şi electrolitice, cât şi pentru disocierea electrolitică a celor din urmă.

b) Apa ca solvent face posibilă mişcarea liberă prin difuziune a substanţelor dizolvate, iar prin realizarea deplasării lor prin porii membranelor biologice

semipermeabile, contribuie la instalarea osmozei şi a presiunii osmotice.

c) Prin căldura sa specifică maximă, apa absoarbe la încălzire cantităţi mari de căldură, pe care le eliberează în cursul răcirii.

Caracterul polar al apei

Apa este una dintre substanţele anorganice cu structura cea mai simplă, moleculele sale fiind formate dintr-un singur atom de oxigen, cuplat prin legături covalente cu doi atomi de hidrogen. Ca urmare, din punct de vedere electrostatic, moleculele de apă trebuie să fie perfect neutre. Deşi moleculele de apă nu posedă sarcini electrice libere, ele dispun de un câmp electric perceptibil, cu intensitatea de 10^{18} coulomb/cm. Această forţă electrostatică este creată de aşezarea asimetrică a celor 3 atomi în moleculă. Cei doi atomi de hidrogen nu sunt aşezaţi pe acelaşi plan orizontal cu oxigenul, ci planul lor formează un unghi de 105° cu planul celor două valenţe ale oxigenului. Ca urmare, repartiţia electronilor în molecule devine inegală, din care cauză densitatea electronilor va fi mai mare la polul oxigenului şi mult mai mică la polul celor doi atomi de hidrogen. Moleculele astfel polarizate se numesc dipoli. Câmpul electric stabilit în jurul lor se numeşte moment dipolic, a cărui intensitate se măsoară în unităţi *Debye* (D) calculate pe baza măsurării travaliului util posibil: forţa înmulţită cu deplasarea a cărei valoare în cazul apei este de 1,86 D.

Din caracterul polarizat al moleculelor de apă rezultă că ele sunt aşezate totdeauna în mod strict orientat: polul lor negativ se orientează spre polul pozitiv al moleculei învecinate şi invers. În cazul în care moleculele învecinate se găsesc suficient de aproape (la o distanţă minimă de 0,28 nm = 2,8 Å), se pot forma şi punţi de hidrogen între ele. Această orientare ordonată a ansamblelor moleculelor de apă este cu atât mai constantă, cu cât temperatura mediului este mai mică. La o temperatură de sub 0°C (îngheţare), toţi atomii de hidrogen sunt legaţi prin punţi de hidrogen. Din această cauză, fiecare atom de oxigen din moleculă, fixează prin legături de hidrogen încă 4 molecule de apă, cu formarea unei structuri hexagonale caracteristice. Din cauza spaţiului închis în mijlocul structurii, volumul gheţii este cu a noua parte mai mare, decât volumul apei neîngheţate. La temperatura topirii, 15% din punţile de hidrogen se descompun.

Este de mult cunoscut că densitatea apei este maximă la temperatura de +4°C şi că aceasta este de o importanţă fundamentală pentru animalele acvatice. În urma îngheţării lor, din cauza formării cristalelor de gheaţă, precum şi a creşterii volumului apei îngheţate, celulele se distrug. Această distrugere poate fi prevenită prin *liofilizare*, adică prin extragerea totală în vid a apei, urmată de congelarea produselor. Preparatele liofilizate pot fi păstrate pe un timp practic nelimitat şi revitalizate prin adăugarea apei evaporate.

La temperatura de 40°C circa 50-55% din legăturile de hidrogen intermoleculare se descompun şi apa va fi mai fluidă. Această temperatură reprezintă cel de-al doilea punct de topire a apei, care este foarte aproape şi de temperatura optimă a desfăşurării fenomenelor vitale.

Apa ca solvent

Pe baza structurii chimice şi a proprietăţilor fizice, apa este un solvent ideal pentru substanţele polare, electrolitice şi neelectrolitice. Substanţele apolare (grăsimile, lipidele) sunt insolubile în apă şi formează emulsii apoase numai în prezenţa unor *detergenţi amfifatici*.

În cursul dizolvării, moleculele de apă şi particulele substanţelor dizolvate intră în interacţiuni multiple, din care cauză proprietăţile soluţiilor (punctul de topire şi de fierbere, presiunea osmotică) se deosebesc de cele ale solventului pur. Deoarece activitatea osmotică a particulelor dizolvate este determinată de *numărul* şi nu de masa acestora, pentru exprimarea concentraţiei soluţiilor, în locul cantităţilor procentuale, se prevede folosirea *concentraţiilor molare/litru*.

Concentraţia molară a unei substanţe dizolvate exprimă numărul moleculelor gram (masa moleculară exprimată în g), prezente într-un litru de apă. Soluţiile cu acelaşi volum şi concentraţie molară identică a diferitelor substanţe conţin acelaşi număr de particule dizolvate. De ex. soluţia de glucoză 1 mol/l conţine 180 g glucoză/l (18 mg %), una de aceeaşi molaritate de uree 60 g/l (6 mg %). Este evident că, în contrast cu concentraţia procentuală de 3 ori mai mare a soluţiei de 1 mol/l a glucozei, decât a ureei, numărul particulelor dizolvate al ambelor substanţe este perfect egal.

François Marie Raoult a constatat, în 1883, că presiunea vaporilor soluţiilor este totdeauna mai mică, faţă de cea a solventului pur. Această scădere este direct proporţională cu concentraţia molară a substanţelor dizolvate, din care cauză temperatura de fierbere va fi mai mare şi cea de congelare va fi mai mică, în raport cu cele ale solventului pur. Astfel, o soluţie molară a unei substanţe neelectrolitice fierbe la +100,52°C şi congelează la -1,85°C. Dat fiind că aceste valori se modifică în mod absolut identic cu modificările concentraţiilor molare ale substanţelor dizolvate, pe baza valorilor determinate cu ajutorul unor instalaţii sensibile şi exacte (*ebulioscop, crioscop*), se pot calcula concentraţiile lor molare corespunzătoare.

În contrast cu soluţiile neelectroliţilor (glucoza, ureea), soluţiile apoase ale electroliţilor vor prezenta valori crioscopice sau ebulioscopice de mai multe ori mai mari, decât cele calculate. De ex., punctul crioscopic al unei soluţii de NaCl 1 mol/l în loc de -1,85°C este de -3,7°C, ceea ce înseamnă o *dublare* a particulelor prezente în soluţie. În cursul dizolvării lor, ionii de Na^+ şi Cl^- se *disociază electrolitic* şi se izolează prin *învelişul hidratat* format în jurul lor de stratul sferic al dipolilor de apă.

Difuziunea şi osmoza

Legile gazelor, formulate de Joseph Louis Gay-Lussac (1808) şi de Amadeo Avogadro (1911), sunt valabile şi pentru soluţii. Volumul gazelor este echivalent cu volumul soluţiilor, iar presiunea lor corespunde *presiunii osmotice* a soluţiilor. Presiunea osmotică reprezintă presiunea care apare între o soluţie şi un solvent pur, aflate în două compartimente, separate între ele printr-o membrană semipermeabilă, care permite traversarea solventului, însă nu şi a substanţelor dizolvate. Presiunea osmotică reprezintă deci acea

creştere a presiunii, care apare din cauza intrării apei prin difuziune în compartimentul închis al solventului. La temperatura constantă de 0°C (*273° Kelvin*) şi la presiunea exterioară de 1 bar, valoarea presiunii osmotice a unei soluţii cu concentraţia de 1 osmol/l este de 22,41 bar. Un litru de soluţie cu activitate osmolară de un osmol conţine un număr de 6,023 x 10^{23} particule dizolvate. Ca urmare, o soluţie cu acest număr de particule are punctul ebulioscopic de +100,52°C, punctul crioscopic de -1,85°C şi presiunea osmotică este 22,41 bar.

Conţinutul în substanţe anorganice şi organice al apei lagunelor oceanului străvechi a creat condiţii prielnice pentru formarea biostructurilor şi apariţia formelor celor mai simple ale vieţii pe Pământ. În asemenea condiţii, nici înglobarea carburanţilor, nici eliminarea produşilor de degradare nu au solicitat necesităţi energetice deosebite. În cursul filogenezei însă, majoritatea vieţuitoarelor au părăsit marea şi s-au acomodat vieţii pe uscat, prin dezvoltarea mediului intern cu *homeostazia*, adică cu volumul lui stabil şi cu compoziţia sa optimă stabilă. La animalele superioare, menţinerea constantă a homeostaziei, adică a volumului şi compoziţiei mediului intern, este asigurată prin funcţionarea unor mecanisme de reglare complicate şi organizate pe nivele multiple. Aceste mecanisme menţin *izovolemia*, adică volumul optim al lichidelor din organism; *izoosmoza* şi *izoionia* sau cantitatea optimă a neelectroliţilor şi şi electroliţilor cu molecularitate redusă; *izohidria*, adică reacţia normală a mediului (aciditatea, concentraţia ionilor de H^+). Tabelul 18 prezintă modificările compoziţiei lichidelor tisulare manifestate în cursul filogenezei, în comparaţie cu compoziţia apei de mare.

Tabelul 18

Modificările compoziţiei lichidelor tisulare manifestate în cursul filogenezei, în comparaţie cu compoziţia apei de mare

	Na^+ mmol/l	K^+ mmol/l	C^- mmol/l	HCO_3^- mmol/l
Apa de mare	440	9	520	-
Mamifere	430	14	490	-
Planarii	440	13	480	-
Artropode	460	10	480	-
Peşti	228	7	164	-
Mamifere	145	5	105	25

5.2. Sângele

Sângele reprezintă partea circulantă a mediului intern. Este un ţesut lichid, compus din elementele figurate (45%) şi dintr-o substanţă fundamentală fluidă, plasma sanguină (55%). Raportul procentual valoric al acestor două componente, numit *hematocrit*, poate fi determinat cu ajutorul centrifugării în condiţii standardizate a sângelui recoltat pe anticoagulant. Volumul sanguin total al unui organism sănătos adult este de 5 l, dintre care 3 l se găsesc în circulaţie, iar restul de 2 l în diferite depozite, ca ficatul şi splina.

5.2.1. Volumul şi osmolaritatea plasmei

Volumul plasmei circulante, calculat din valoarea normală a hematocritului (45% elemente figurate, 55% plasmă), este de 1650 ml, ceea ce corespunde *izovolemiei*. Punctul crioscopic al plasmei sanguine este de -0,56°C, ceea ce corespunde unei concentraţii osmolare de 0,303 osmol/l sau 303 mosmol/l (0,56 : 1,85 = 0,303). Reiese că această activitate osmotică este echivalentă cu o presiune de 6,723 bar (22,41 x 0,3). În comparaţie cu membranele artificiale semipermeabile propriu-zise, membranele biologice delimitante ale compartimentelor intra- şi extracelulare permit traversarea simultană atât a apei, cât şi a substanţelor micromoleculare dizolvate. Din această cauză, fluxul lichidelor biologice este determinat prin diferiţii gradienţi de concentraţie, manifestându-se totdeauna dinspre compartimentul cu concentraţia mai mare spre cel cu concentraţia mai redusă. Cantităţile exprimate în mmol/l ale electroliţilor, neelectroliţilor şi ale proteinelor din plasmă, lichid tisular şi celule umane sunt prezentate cifric în tabelul 19.

Reiese că 96% din activitatea osmotică a plasmei sanguine este realizată de electroliţi. Restul de 4% (20 mosmol/l) le revine neelectroliţilor (glucozei, ureei, creatininei).

a) *Sodiul plasmatic.* Fiind prezenţi într-o concentraţie de 142 mmol/l, ionii de Na^+ predomină în plasmă (dintre cationi). Din această cauză, paralel cu modificările sodemiei apar totdeauna şi schimbările corespunzătoare ale osmolarităţii. Astfel, hipersodemia înseamnă în acelaşi timp şi hiperosmoză, iar în caz de hiposodemie, scade concomitent şi osmolaritatea plasmei. Excesul de sodiu în urma unui aport zilnic de 2-6 g (6-15 g NaCl, 87-260 mmol) se elimină sub controlul aldosteronului prin urină (95%), prin scaun (4,5%) şi sudoare (0,5%).

Tabelul 19

Conţinutul în mmol/l al electroliţilor, neelectroliţilor şi al proteinelor din plasmă, lichidul tisular şi din celulele umane

Componenţi	Plasmă	Lichid	Celule
Cationi:			
Na^+	142	145	10
K^+	4	4	160
Ca^{++}	3	3	1
Mg^{++}	1	1	13
Total	150	153	184
Anioni:			
Cl^-	101	114	3
HCO_3	27	31	10
$H_2PO_4H_2^-$	2	2	100
HSO_4^-	1	1	20
Ac. anorg.:	3	7	–
Proteine	0,8	0,2	4

b) *Potasiul plasmatic.* Conţinutul normal în potasiu al plasmei oscilează între 4-4,5 mmol/l. Atât scăderea potasemiei sub 3,5 mmol/l, cât şi creşterea ei peste 5,5 mmol/l duce la manifestarea tulburărilor neuromusculare şi cardiovasculare. Printr-o alimentaţie obişnuită ajung în tubul digestiv 1-5 g/zi (90-110 mmol/l) potasiu. Aldosteronul inhibă reabsorbţia ptasiului la nivelul tubilor renali distali; astfel în boala Addison se acumulează cantităţi mari de potasiu în plasmă şi în ţesuturi. În condiţiile unei hipopotasemii se dezvoltă o alcaloză metabolică extracelulară, însoţită de o acidoză intracelulară.

c) *Calciul plasmatic.* Plasma normală conţine 2,3-2,5 mmol/l calciu, din care 48% se găsesc sub formă neionizată, legată de proteinele plasmei şi de alţi componenţi insolubili (fosfaţi, citraţi, bicarbonaţi, săpunuri de acizi graşi). Gradul de ionizare a sărurilor de calciu scade în mediu alcalin, de aceea predispoziţia manifestării unei spasmofilii creşte în cursul alcalozelor metabolice şi/sau respiratorii. Aportul zilnic de calciu prin alimente este de circa 1 g (25 mmol), din care se reabsorb doar 10-20%. Prin urină se elimină zilnic 6-8 mmol/l Ca^{++}, sub formă de citraţi şi oxalaţi.

La bolnavi cu hiperfuncţie paratiroidiană (boala Recklinghausen) eliminarea urinară a calciului creşte foarte mult. *Parathormonul* mobilizează calciul din oase, *tireocalcitonina* stimulează depunerea lui. Vitaminele D (vitamina D2 = ergocalciferolul, vitamina D3 = colecalciferolul şi 1,25-dihidroxi-calciferolul) cresc reabsorbţia intestinală a calciului. Calciul extracelular, ionii de Ca^{++} acţionează ca activatorii diferiţilor factori de coagulare, ai sistemului properdinic şi de complement. Pe plan intracelular

d) *Magneziul plasmatic.* Din conţinutul total în magneziu al organismului 35% se găseşte intracelular, 64% în oase şi numai 1% în lichidele extracelulare (de ex. în plasmă într-o concentraţie de 0,7-1,1 mmol/l). Zilnic ajung în intestin sub formă de săruri circa 10-12 mmol magneziu şi se elimină prin urină circa 4-6 mmol. Creşterea magnezemiei duce la adinamie, tahicardie, hiporeflexie, hipotensiune şi tulburări respiratorii. În caz de hipomagnezemie creşte excitabilitatea neuromusculară, apar tulburări cardiace şi hipertensiune arterială.

e) *Oligoelementele.* În această grupă sunt cuprinse o serie de metale ca fierul, cuprul, zincul, cobaltul, manganul, aluminiul, cromul, plumbul, nichelul şi aurul, care se găsesc în organism în cantităţi reduse. Din acest motiv, dar şi din cauza faptului că în plasmă apar sub formă legată de proteine specifice transportoare, sărurile acestor elemente nu influenţează osmolaritatea, dar joacă roluri biologice deosebite în organism, care vor fi prezentate în capitolele respective.

5.2.2. Izoosmoza şi izoionia

Izoosmoza reprezintă una din condiţiile de bază ale păstrării integrităţii biostructurilor. Într-un mediu hiperosmotic celulele cedează apa spre exterior şi îşi pierd din volum. În medii hipoosmotice, însă, din cauza pătrunderii excesive a apei în interiorul lor se umflă, chiar până la spargere. Soluţia izoosmotică de NaCl conţine 9 g sare pe litru, adică câte 154 mmol/l de Na^+ şi Cl^-. Această soluţie are punctul crioscopic de -0,560 C, osmolaritatea de 302,6 mmosm/l, respectiv presiunea osmotică de 6,723 bar.

Integritatea biostructurilor reprezintă, însă, numai una din condiţiile de bază ale desfăşurării proceselor vitale. Sidney Ringer a observat în 1880, că inima de broască funcţionează pe o perioadă mult mai lungă în cazul în care la soluţia izoosmotică (pentru broască: 222mosm/l, 6,5 g/l) se adaugă şi clorurile de potasiu şi de calciu. Compoziţia soluţiei fiziologice a fost completată de Spiller Locke, în 1895, cu bicarbonatul de sodiu şi de John Tyrode cu clorura de magneziu şi fosfat secundar de sodiu. În urma irigării lor îndelungate cu asemenea soluţii fiziologice, ţesuturile fixează cantităţi din ce în ce mai mari de lichid şi devin edematoase. Pentru prevenirea acestui fenomen, la soluţiile fiziologice se mai adaugă şi substanţe macromoleculare (albumină serică, dextran polivinil-pirolidonă) care nu pot traversa endoteliul vascular, rămân în interiorul vaselor şi prin *activitatea lor coloido-osmotică*, reabsorb pe partea venoasă a capilarelor, cantităţi însemnate de apă.

Reiese că, dincolo de asigurarea izoosmolarităţii, pentru desfăşurarea optimă a proceselor vitale, mai este necesar şi raportul optim al ionilor, exprimat de formula lui Paul György:

$$\frac{(K^+) \cdot (HCO_3^-) \cdot (HPO_4^{--})}{(Ca^{++}) \cdot (Mg^{++}) \cdot (H^+)} = K$$

Creşterea valorii K duce la intensificarea transmiterii periferice a influxurilor nervoase; scăderea provoacă descreşterea acestora. Toate acestea nu înseamnă, însă, că raporturile interionice din plasmă sunt stabilite între limite prea strânse. De ex.: parte a ionilor de Na^+, împreună cu clorurile cuplate, poate fi înlocuită cu cantităţi echivalente de neelectroliţi (manitol, zaharoză, uree). În mod similar şi clorurile pot fi substituite cu cantităţile corespunzătoare ale altor anioni (bromuri, azotaţi).

5.2.3. Lichidul tisular

Lichidul tisular sau interstiţial formează acea parte a compartimentelor de apă care se situează atât în afara celulelor, cât şi a circulaţiei. Limfa şi lichidul cefalorahidian, deşi circulă în sisteme proprii, sunt încadrate la acest compartiment tisular. Lichidul interstiţial este despărţit de plasma sanguină prin peretele endotelial al capilarelor. Celulele endoteliale sunt fixate între ele printr-o reţea glucoproteinică formată de adezine (fibronectină). Cuplarea celulelor endoteliale este însă discontinuă, deoarece între ele apar nişte orificii, cu diametrul între 4,0-4,5 nm (40-45 Å). Din această cauză peretele capilar se comportă ca o *membrană poroasă*. În mediu apos, schimburile de substanţe prin porii unor asemenea membrane se pot manifesta atât printr-un schimb hidrodinamic al lichidelor din compartimente urmat şi de modificarea volumului, cât şi printr-o difuziune simplă, fără modificarea volemiei. Ambele forme au la bază două mecanisme deosebite: a) moleculele substanţelor liposolubile şi ale gazelor (oxigenul, bioxidul de carbon) traversează în mod direct membrana; b) moleculele de apă, electroliţii şi neelectroliţii polari ajung în lichidul tisular, respectiv din lichid în plasmă, prin traversarea porilor interendoteliali.

5.2.4. Schimburile hidrodinamice şi difuziunea

În cazul unui schimb hidrodinamic, cele două compartimente de apă sunt depărţite de o membrană poroasă, permeabilă atât pentru apă, cât şi pentru substanţele micromoleculare dizolvate. În cazul în care diametrul porilor este suficient de mare (peste 3 nm = 30 Å), deplasarea apei şi a substanţelor dizolvate nu are loc pe baza presiunii osmotice, ci din cauza unor gradienţi de concentraţie. În cazul în care într-unul din cele două compartimente se manifestă o *presiune hidrostatică*, aceasta forţează

deplasarea soluţiei în sens unic prin pori, cu toţi componenţii săi. În cazul unor micropori cu diametrul de sub 3 nm, traversarea acestora de către proteinele din soluţie va fi împiedicată de măsura dimensiunilor lor moleculare. Între cele două compartimente se va stabili astfel un gradient proteinic şi concomitent unul coloido-osmotic. Tot din cauza acestei difuziuni împiedicate, similară filtrării, cantitatea proteinelor din lichidele tisulare (30-40 g/l) este substanţial mai mică decât a celor din plasmă (60-80 g/l).

Această *presiune coloido-osmotică* este constantă în toată extinderea plasmei circulante, având valoarea normală de 25 mbar. În partea arterială a capilarelor, presiunea sistemică ce începe cu valoarea maximă în orificiul aortei şi coboară treptat, ajungând la valori negative în vene la nivelul porţiunii arteriale a capilarelor, produce filtrarea unei cantităţi definite de lichid şi substanţe dizolvate din plasmă în ţesuturi. Spre porţiunea venoasă, însă, presiunea sistemică scade sub valoarea presiunii coloido-osmotice. Ieşind de sub suprimare, aceasta din urmă va realiza redifuziunea în plasmă a apei şi a substanţelor dizolvate. În urma creşterii presiunii sistemice filtrante (*stază*) sau a scăderii presiunii coloido-osmotice (*hipoproteinemie*) are loc manifestarea *edemelor*. Desfăşurarea schimburilor hidrodinamice între plasma sanguină şi lichidul tisular, în funcţie de raportul dintre presiunea sistemică şi cea coloido-osmotică, este prezentată după Starling, în figura 75.

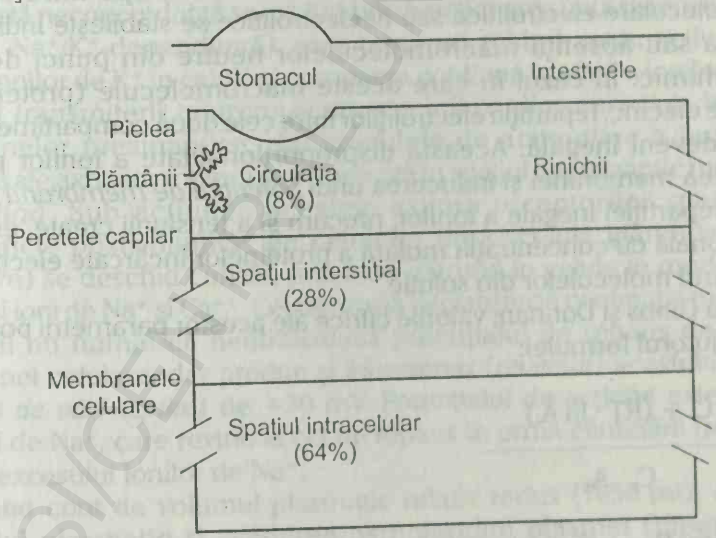


Fig. 75. Rolul presiunii coloido-osmotice în reglarea schimburilor hidrodinamice la nivelul capilarelor.

Difuziunea moleculelor de apă şi de substanţe dizolvate are la bază mişcarea termică a acestora, din care cauză ele tind să umple în întregime spaţiul disponibil. Din această cauză difuziunea are loc totdeauna în sensul stabilit de gradientul de concentraţie. Conform legii lui Fick, la o temperatură constantă, cantitatea deplasată pe unitatea de timp a unei substanţe

micromoleculare prin porii unei membrane este direct proporţională cu diametrul porilor şi cu mărimea gradientului de concentraţie între cele două compartimente. Valoarea cifrică a acestei relaţii dă constanta de difuziune, care este invers proporţională cu masa moleculară a substanţei. De ex. valoarea constantei de difuziune a bioxidului de carbon este de 200 ml/min/bar, a moleculelor de oxigen, însă, de 10 ori mai mică (20 ml/min/bar).

Ca şi în cazul reacţiilor chimice reversibile, desfăşurarea continuă a schimburilor de apă şi de substanţe micromoleculare între două compartimente nu se opreşte în urma stabilirii stării de echilibru nici în cazul difuziunii prin pori. Din momentul echilibrării reciproce a gradienţilor de concentraţie, se stabileşte o *stare staţionară aparentă*, dar pe baza unui *echilibru dinamic* caracterizat prin realizarea în ambele sensuri şi în egală măsură a schimburilor.

5.2.5. Biopotenţialul de membrană

Între două compartimente, separate printr-o membrană microporoasă, echilibrarea dinamică a gradienţilor de concentraţie între substanţe micromoleculare electrolitice sau neelectrolitice se stabileşte indiferent de prezenţa sau absenţa macromoleculelor neutre din punct de vedere electrochimic. În cazul în care aceste macromolecule (proteine) sunt încărcate electric, repartiţia electroliţilor între cele două compartimente separate va deveni inegală. Această disproporţionalitate a ionilor provoacă polarizarea membranei şi inducerea unui *potenţial de membrană* (90 mV). Măsura repartiţiei inegale a ionilor, precum şi a tensiunii create, este direct proporţională cu concentraţia molară a proteinelor încărcate electric, adică cu numărul moleculelor din soluţie.

După Gibbs şi Donnan, valorile cifrice ale acestor parametrii pot fi calculate cu ajutorul formulei:

$$V = \frac{C_i + (RT \cdot \ln A_i)}{C_e \cdot A_e}$$

în care, R = constanta universală a gazelor: T = temperatura măsurată în grade Kelvin; ln = logaritmul natural; C_i şi C_e, respectiv A_i şi A_e = concentraţia molară în compartimentul interior (i) şi exterior (e) a cationilor (C) şi a anionilor (A).

Reiese că, în compartimentul cu un gradient de proteine încărcate electric, concentraţia finală a cationilor va fi mai mare, iar cea a anionilor mai mică. În comparaţie cu situaţiile realizate în sisteme în *vitro*, în celulele vii, *valorile reale* sunt totdeauna mai mari decât *cele calculate* pe baza concentraţiilor existente ale ionilor şi proteinelor. Această neconcordanţă

aparentă se explică prin faptul că, în membranele celulelor există şi funcţionează diferite sisteme de transport activ care, pe baza unui consum de energie sub forma unui *travaliu osmotic*, realizează şi menţin unele diferenţe ale concentraţiilor ionice, în ciuda şi împotriva unor gradienţi de concentraţie.

Curentul bioelectric

Luigi Galvani a observat, în anul 1791, că între porţiunile intacte şi lezate ale ţesuturilor animale vii poate fi măsurat un potenţial, sub forma unui *curent de leziune*. Ulterior a devenit clar că acest potenţial bioelectric (-90 mV), sub forma potenţialului de repaus, există şi în celule intacte, între partea internă, electronegativă şi externă, electropozitivă a membranelor. Valoarea cifrică a acestui potenţial poate fi calculată exact. În cazul concordanţei valorilor intra- şi extracelulare ale unui ion calculate şi măsurate în realitate, valoarea potenţialului electrochimic al ionilor este egală de ambele părţi ale membranei. În starea de repaus, valabilă pentru ionii de potasiu şi de clor, potenţialul electrochimic al ambilor ioni corespunde valorii calculate de -90 mV. *Potenţialul de repaus* al celulelor este deci un *potenţial de potasiu*, adică *de cloruri*.

În comparaţie cu valoarea calculată de -90 mV, valoarea măsurabilă a potenţialului electrochimic al ionilor intracelulari de Na^+ este de numai -65 mV. Această neconcordanţă se explică prin funcţionarea unui sistem enzimatic (ATP-aza Na^+/K^+-dependentă), care printr-un schimb ionic activ duce la retenţia ionilor de K^+ în celulă şi pomparea continuă în afară a ionilor de Na^+. În cursul transmiterii neuromusculare a influxurilor nervoase la nivelul membranelor presinaptice, din granulele de acumulare a butoanelor terminale ale axonilor motorii se eliberează în spaţiul intersinaptic mediatorul *acetilcolină*. Sub acţiunea acesteia asupra receptorilor specifici, în membranele postsinaptice ale celulelor ţintă (celule glandulare, fibre musculare) se deschid canale, prin care pătrund în celule în mod exploziv numeroşi ioni de Na^+ şi Ca^{++}. Cei din urmă declanşează contracţia musculară, cei dintâi nu numai că neutralizează potenţialul de repaus de -90 V al membranei celulare, dar produc şi *inversarea* (*reversal*) acestuia, până la *valoarea de vârf* (*spike*) de +30 mV. Potenţialul de acţiune este deci un potenţial de Na^+, care revine la cel de repaus în urma eliminării (*pompării*) active a excesului ionilor de Na^+.

Ţinând cont de volumul plasmatic relativ redus (1650 ml), creşterea volumului plasmatic şi scăderea osmolarităţii plasmei (hipervolemie hipoosmotică) ar fi posibile chiar şi în urma unui consum moderat de lichide. Compartimentele de apă sunt însă delimitate între ele prin membrane poroase, ceea ce înseamnă că, echilibrarea prin difuziune a volumelor de apă şi a concentraţiilor de substanţe are loc continuu. Astfel, cantităţile de apă, de electroliţi şi neelectroliţi cu particule mici, nu se distribuie în volumul de un litru şi jumătate al plasmei, ci şi în spaţiul interstiţial, devenind de 8-10 ori mai mare. Acest volum este numit şi *"volumul prerenal"*, deoarece depozitează temporar, dar imediat, cantităţi considerabile de apă şi substanţe dizolvate, până la excreţia definitivă renală a acestora.

5.2.6. Izoosmoza și izovolemia

Stabilitatea mediului intern cuprinde ca parametri fundamentali şi constanta *activităţii osmotice* (*osmolarităţii*), *adică a izoosmozei* şi a *volumului plasmatic* (*izovolemia*), care se modifică totdeauna împreună. În cursul schimbărilor hidrodinamice patologice, aceşti parametri se pot modifica în ambele sensuri, adică atât în sensul scăderii, cât şi al creşterii lor. Totuşi, în practica medicală apar cel mai frecvent următoarele combinaţii: a) *hipovolemia izoosmotică* (hemoragii); b) *hipovolemia hiperosmotică* (exsiocoză, pierdere de apă); c) *hipovolemia hipoosmotică* (carenţă, pierdere de sare) şi d) *hipervolemia izoosmotică* (hiperfuncţie corticosuprarenală, perfuzii excesive).

Osmolaritatea plasmei poate fi determinată cu ajutorul determinării punctului crioscopic sau în mod direct cu un osmometru. În lipsa acestora, din cantitatea plasmatică a unor compuşi osmoactivi (ureea, glicemia, Na^+ şi K^+), valoarea destul de reală a osmolarităţii poate fi calculată cu ajutorul formulei următoare:

$$\text{(Uree mmol/l)} + \text{(Glicemie mmol/l)} + 2(Na^+ + K^+ \text{ mmol/l}) = \text{mosm/l}$$
$$5 + 5 + 294 = 304 \text{ mosm/l}$$

Volumul plasmatic poate fi determinat cu ajutorul evaluării gradului de diluare în plasma circulantă a unui colorant macromolecular (albastru Ewans, *Ewans blue*). Metoda modernă foloseşte pentru acest scop albumina serică umană marcată cu iod radioactiv (*Radio Iodine Marked Serum Albumin, RISA*), furnizând într-un minut (timpul necesar recirculării substanţei) valoarea solicitată.

Volumul spaţiului interstiţial poate fi determinat prin injectarea intravenoasă a cantităţilor cunoscute ale unor substanţe neutre, care, deşi părăsesc circulaţia, nu pot pătrunde în celule (ca *insulina*, *manitolul* şi *tiosulfaţii*). Pentru determinarea volumului total al compartimentelor de apă se folosesc substanţe care pătrund uşor şi în celule, ca antipirina şi apa grea (D_2O). Deşi volumul intracelular nu poate fi determinat separat şi în mod direct, poate fi apreciat, însă, prin scăderea din valoarea volumului total al compartimentelor de apă, suma volumului interstiţial şi plasmatic.

a) **Reglarea volemiei şi a osmolarităţii.** Prin eliminarea excesului, respectiv retenţia cantităţilor necesare de apă, electroliţi şi neelectroliţi, organele efectoare ale menţinerii între limitele normale ale volemiei şi osmolarităţii sunt rinichii. Reglarea acestor funcţii efectoare se realizează însă prin intermediul şi interacţiunea multiplelor mecanisme umorale şi nervoase.

Conservarea apei. Mecanismul osmo-neuro-umoral al reglării volemiei a fost descoperit de Ernest Basil Verney prin demonstrarea faptului că prin creşterea osmolarităţii plasmei circulante se excită în mod direct

osmoreceptorii neuronilor din centrii osmoreglatori hipotalamici. Semnalele se transmit în lobul posterior al hipofizei, unde provoacă eliberarea hormonului antidiuretic (adiuretina, ADH). Hormonul eliberat în sânge este transportat la rinichi, unde duce la creşterea permeabilităţii faţă de apă a tubilor colectori. Din mediul hipoosmotic intratubular, apa trece spontan (fără nici un consum energetic) în ţesutul hiperosmotic interstiţial, de unde pătrunde din nou în sângele *vaselor recte peritubulare*. Ca urmare, se va elimina un volum mai mic de urină, dar mai concentrată şi va creşte volumul plasmatic, paralel cu scăderea consecutivă a osmolarităţii sale.

Deoarece în urma creşterii volumului plasmatic creşte şi tensiunea arterială, în reglarea volemiei sunt cuprinse şi semnalele emise de *baroreceptori* (receptori sensibili la modificările presiunii sistemice). Receptorii de acest gen se găsesc în pereţii venelor mari şi ai atriilor şi transmit semnalele spre centrii hipotalamici. Spre deosebire de cele ale osmoreceptorilor, semnalele baroreceptorilor ajunse în centrii hipotalamici provoacă inhibarea eliberării ADH din depozitele posthipofizare. Acest *arc reflex baro-neuro-hormonal*, prin reducerea secreţiei ADH, duce la scăderea permeabilităţii faţă de apă a pereţilor tubilor colectori renali. Ca urmare, se va reduce şi reabsorbţia apei în circulaţie, se va elimina o urină voluminoasă şi diluată, respectiv volumul plasmatic se va reduce paralel cu creşterea osmolarităţii.

Din cauza capacităţii sale strâns determinate de limitele funcţionale renale, acest mecanism al conservării apei poate asigura echilibrarea devierilor volemiei şi osmolarităţii plasmei, numai până la o anumită limită. Pentru funcţionarea optimă a mecanismului este necesar un *aport zilnic suficient de apă*. Scăderea sub o valoare critică a volemiei şi/sau creşterea excesivă a osmolarităţii plasmei provoacă apariţia senzaţiei de sete. Această senzaţie porneşte tot din osmoreceptorii hipotalamici, înaintează spre zonele corticale senzitive, unde se manifestă senzual. În urma satisfacerii setei (consum de apă sau lichid) creşte din nou volumul plasmatic, scade osmolaritatea şi temporar se restabileşte echilibrul între izovolemie şi izoosmoză.

b) **Conservarea sărurilor.** Desfăşurarea normală a proceselor vitale este periclitată în egală măsură, atât din cauza lipsei (hipoosmoză), cât şi excesului sărurilor (hiperosmoză). Rinichii joacă rolul fundamental şi în reglarea acestor parametri, dar în acest caz sub controlul *corticosuprarenalelor*, prin secreţia lor de *aldosteron*. Prin creşterea reabsorbţiei sodiului şi a excreţiei potasiului la nivelul tubilor renali distali, acest hormon produce paralel cu scăderea eliminării sodiului şi creşterii excreţiei urinare a potasiului, o hipersodemie şi o hipopotasemie marcată.

Celulele producătoare de aldosteron din zona glomerulară a corticosuprarenalelor recepţionează direct modificările sodemiei. În urma scăderii acesteia (ceea ce în acelaşi timp înseamnă şi hipoosmoză), sporeşte imediat producţia de aldosteron care, acţionând în sensul creşterii retenţiei tubulare a sodiului, duce la scăderea sau corectarea hipoosmozei.

Reabsorbţia tubulară a sodiului este urmată în mod pasiv de reabsorbţia cantităţilor echivalente de ioni de clor – care, fiind puternic hidrataţi, aduc în circulaţie cantităţi considerabile de apă, care vor creşte şi volumul plasmatic.

Rinichii participă, însă, la osmoreglare şi printr-un mecanism propriu. Aparatul juxtaglomerular, descris de Goormagnight situat în apropierea glomerulilor şi format dintr-un ansamblu al *celulelor mioepiteliale* din peretele vaselor precapilare şi al celulelor mai groase (*macula densa*) din epiteliul tubular proximal, dispune de receptori sensibili faţă de modificările presiunii şi osmolarităţii sângelui care trece prin rinichi. Celulele acestui aparat, alături de o glucoproteină stimulatoare a hematopoiezei numită *eritropoetină*, mai depozitează în citoplasma lor, sub formă de granule, o enzimă proteolitică numită *renină*. În cazul scăderii irigaţiei renale cu sânge, renina se eliberează prin degranulare. Această protează descompune o proteină alfa-glubulinică din plasmă, numită angiotensinogen, prin eliberarea unui decapeptid numit *angiotensină-I*. Aceasta este încă inactivă, dar sub acţiunea unei alte peptidaze, numită *angiotensinază* sau *convertază* (*Angiotensin Coverting Enzyme, ACE*), prin eliberarea proteolitică a doi aminoacizi terminali, se transformă într-un octapepdid, numit *angiotensină-II*, care este purtătorul de semnal propriu-zis al sistemului osmoreglator. Acţiunea vasoconstrictoare a angiotensinei-II se manifestă pe de o parte la nivelul pereţilor arteriolelor precapilare, ducând la creşterea marcantă şi generalizată a presiunii arteriale sistemice; pe de altă parte, stimulează puternic producţia de aldosteron în celulele zonei glomerulare. În ciuda efectelor sale vasoconstrictoare puternice, se pare că rolul fiziologic primordial al *sistemului renină-angiotensină* constă totuşi în reglarea volemie şi a osmolarităţii plasmatice, prin acţiunile cunoscute ale aldosteronului, manifestate la nivelul tubilor renali proximali.

Reiese că menţinerea volemiei şi a osmolarităţii optime a organismului se realizează prin funcţionarea şi conlucrarea unor mecanisme umorale şi nervoase. Devierile osmolarităţii sunt compensate prin modificările corespunzătoare ale volemiei şi invers. Este de remarcat că mecanismele de reglare sunt totuşi mai sensibile faţă de modificările osmolarităţii. Se pare că la baza acestui fapt stau fenomene din fazele foarte precoce ale filogenezei: pentru vieţuitoarele acvatice primitive, adaptate vieţii în apă dulce, condiţia fundamentală a supravieţuirii a fost şi este compensarea continuă a consecinţelor hipoosmozei cauzate de pătrunderea excesivă intracelulară a apei.

5.3. Echilibrul acido-bazic

Pentru organismele vii, reacţia mediului intern, dar şi extern, este tot de o importanţă fundamentală. Acest fapt a fost cunoscut şi de Louis Pasteur pe baza observaţiei că microbii nu pot trăi nici în medii prea bazice, nici acide. Deşi majoritatea acizilor şi bazelor, precum şi a sărurilor produse prin

neutralizarea reciprocă a acestora au fost cunoscute de mult, explicaţia exactă a reacţiei soluţiilor a fost dată de Lauritz Sörensen şi Arne Michaelis, în anul 1909. După aceşti cercetători, reacţia soluţiilor este determinată de cantitatea ionilor de hidrogen (protonilor, H^+) prezentă într-un litru (kg) de apă. Deoarece în mediu apos, în urma disocierii electrolitice a acizilor (indiferent de natura lor anorganică sau organică) se eliberează ioni de H^+, iar a bazelor, ioni de OH^-, funcţie de reacţia soluţiei, cantitatea acestora se modifică în sens opus.

După teoria elaborată, în 1923, de către Johannes Nikolaus Brönsted şi John Lowry, fiecare substanţă ionică care în mediu apos se comportă ca *donator de protoni*, adică pune în libertate ioni de H^+, se consideră acid; în schimb, substanţele fixatoare, *acceptoare de protoni* sunt *baze*. Reacţia neutră a apei pure este cauzată de numărul egal al ionilor de H^+ şi OH^- eliberaţi în cursul disocierii electrolitice a moleculelor. Cu ajutorul unor măsurători exacte s-a constatat că la temperatura de 20°C, un litru (kg) de apă conţine 0,0000001 g, adică 10^{-7} g ioni de hidrogen. Masa atomului de hidrogen (1 d) serveşte drept unitate de măsură a celorlalte mase atomice şi moleculare. Astfel, valoarea cifrică a cantităţii H^+ este direct proporţională cu numărul acestor ioni în soluţie. Dat fiind că în aceeaşi cantitate de apă se găsesc un număr egal (10^{-7}) de ioni de hidrogen şi de hidroxil, valoarea *produsului ionic al apei* de $10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$ este totdeauna constantă, indiferent de reacţia soluţiei. Cunoscând cantitatea protonilor dintr-o soluţie cu o aciditate dată, cantitatea ionilor hidroxil poate fi uşor calculată cu ajutorul ecuaţiei de mai sus şi invers. De exemplu, în cazul în care mediul este acid, concentraţiei H^+ egale cu 10^{-3} îi corespunde o concentraţie OH^- de 10^{-11}.

5.3.1. Concentraţia ionilor de hidrogen, noţiunea de pH

Pentru caracterizarea reacţiei soluţiilor se foloseşte valoarea cifrică a cantităţii ionilor de hidrogen, exprimată în g. Conform valorii constante a produsului ionic al apei, aceste cantităţi se pot modifica de la valoarea de 1 (10°) g/l până la 0,00000000000001 (10^{-14}) g/l. Este evident că utilizarea în practică a unor asemenea cifre ar fi foarte nepotrivită. De aceea, la propunerea lui Söre P.L. Sörensen, în acest scop se folosesc valorile cifrice pozitive ale exponenţilor care semnalizează concentraţiile H^+ în soluţii, adică puterea cu semnul negativ la care trebuie ridicată baza 10, pentru a obţine valoarea în g/l a concentraţiei ionilor de hidrogen. Astfel, valoarea de pH = 3 a unei soluţii acide înseamnă concentraţia de H^+ egală cu 10^{-3}, respectiv de 0,001 g/l, iar reacţia neutră este caracterizată de valoarea pH = 7,0, respectiv de concentraţia H^+ egală cu 10^{-7}, adică 0,0000001 g/l.

Din cauza disocierii electrolitice totale (100% având gradul de disociere = 1) în apă, valoarea pH a soluţiilor apoase ale acizilor şi ale bazelor tari, calculată pe baza concentraţiei lor exprimate în g/l la o temperatură stabilită,

corespunde întru totul valorilor măsurate. În schimb, gradul de disociere în apă a acizilor şi bazelor slabe este totdeauna parţial şi incomplet (cu valorile sub 100%, respectiv sub 1); acesta este determinat de reacţia acidă sau bazică a mediului şi de concentraţia acizilor şi bazelor slabe. Astfel, acizii slabi se disociază mai bine în mediu bazic, iar bazele slabe în mediu acid. La concentraţii mari, valoarea gradului de disociere este mică (sub 0,5 respectiv 50%) şi începe să crească numai în urma creşterii diluţiilor, ajungând la valoarea de 1,0 (100%) numai la o diluţie infinit de mare. Valoarea pH a unui electrolit slab la care gradul de disociere a particulelor este de 0,5 (50%) se desemnează cu pK (minus log constantă de disociere) şi reprezintă o caracteristică a proprietăţilor fizico-chimice şi biologice ale acestuia. De exemplu, valoarea pK a disocierii electrolitice a acidului carbonic în HCO_3^- şi H^+ este de 6,1 ceea ce înseamnă că, la această valoare de pH, jumătate (50%) din moleculele de acid carbonic se găsesc nedisociate, având gradul de disociere = 0,5.

5.3.2. Stabilizarea acidităţii soluţiilor: sistemele tampon

Reacţia neutră a apei pure se modifică brusc la adăugarea unor cantităţi mici de acizi sau baze. În cazul în care la un volum de un litru (1 000 ml) de apă pură şi neutră (pH = 7,0) se adaugă numai 1 ml dintr-o soluţie 0,1 N de acid sau bază, valoarea pH-ului soluţiei se schimbă imediat cu 3 unităţi, adică coboară la pH = 3, respectiv la pH = 10. Aceste schimbări sunt cu atât mai importante, cu cât este bine cunoscut că, modificările cu câteva zecimale ale valorii optime, uşor alcaline (pH = 7,42) a acidităţii mediului intern, au consecinţe grave, chiar şi mortale.

Majoritatea produşilor de degradare a metaboliţilor sunt acizi (acidul carbonic, corpii cetonici, acidul lactic, acidul oxalic, acidul uric etc.). În ciuda formării continue a acestor acizi, reacţia sângelui şi a altor lichide biologice rămân totuşi neschimbate. Ca urmare, în aceste lichide trebuie să existe şi să funcţioneze nişte sisteme care pot neutraliza de la moment la moment, efectele de creştere a concentraţiei de H^+ ale acestor acizi. Asemenea sisteme se numesc *sisteme tampon* (*buffer*) şi de obicei sunt compuse dintr-un acid slab (în plasmă, acidul carbonic) şi din sarea acestuia ($NaHCO_3$) formată cu o bază puternică (NaOH). Reacţia soluţiei apoase a acestui sistem tampon, alcătuit din bicarbonat de Na şi acid carbonic, într-o proporţie de 20:1, are un pH = 7,42. În contrast cu apa distilată, prin adăugarea a câte unui ml dintr-o soluţie 0,1 N de HCl, respectiv NaOH, la un volum de 1 000 ml al acestui sistem, concentraţia H^+ în g/l, respectiv valoarea pH, se va modifica doar cu câteva sutimi şi va rămâne practic neschimbată.

5.3.3. Stabilirea valorii pH a unei soluții tampon

Valoarea pH a unei soluţii tampon, numită *aciditatea actuală*, este determinată de raportul cantităţii componentului puternic bazic (sarea acidului slab formată cu o bază puternică) şi a acidului slab. Această valoare rămâne constantă indiferent de cantitatea absolută (în mg, g sau kg) a componenţilor. Prin modificarea acestui raport, în limita capacităţii de disociere a acidului slab, pot fi alcătuite sisteme tampon stabilizate cu valori diferite de pH. Limitele stabilizării acidităţii actuale, adică *capacitatea tampon* a sistemului, este puternic dependentă de cantitatea componenţilor conţinuţi. În cazul sistemului tampon bicarbonat/acid carbonic din plasmă, această dependenţă se explică prin faptul că în soluţia apoasă, ambii componenţi se disociază electrolitic. Spre deosebire de ionii specifici ai componenţilor (Na^+ din sarea bazică şi H^+ din acidul slab, care determină şi aciditatea actuală a sistemului tampon), ionii de HCO_3^- sunt furnizaţi de *ambele substanţe*. Dat fiind că bicarbonatul de Na este un electrolit puternic, care se disociază 100%, suprimând disocierea acidului carbonic, concentraţia actuală a HCO_3^- este determinată de cantitatea sării, iar cea a H^+ este dependentă exclusiv de gradul disocierii actuale a acidului carbonic în condiţiile existente. Ca urmare, valoarea acidităţii actuale (pH) a unei soluţii tampon poate fi calculată din raportul componentului bazic şi a celui acid, iar aciditatea titrabilă (capacitatea tampon) din cantităţile absolute ale acestora:

$$NaHCO_3 \rightleftarrows HCO_3^- + Na^+$$

$$H_2CO_3 \rightleftarrows HCO_3^- + H^+$$

În cazul sistemului tampon bicarbonat/acid carbonic, care reprezintă principalul sistem tampon al plasmei, valorile acestor doi parametri pot fi calculate în felul următor: conform *legii acţiunii maselor (Guldberg-Waage)*, valoarea raportului produsului concentraţiilor H^+ şi HCO_3^- şi a acidului carbonic nedisociat este constantă:

$$\frac{[H^+] \cdot [HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = K$$

Din această formulă se poate exprima valoarea concentraţiei ionilor de H^+:

$$[H^+] = K \cdot \frac{[H_2CO_3]}{[HCO_3^-]}$$

Dat fiind că ionii de bicarbonat prezenţi în soluţia tampon provin practic aproape în întregime din disocierea bicarbonatului de sodiu, valoarea lor poate fi înlocuită în formulă cu concentraţia acestuia:

$$[H^+] = K \cdot \frac{[H_2CO_3]}{[NaHCO_3]}$$

Deoarece logaritmul negativ al valorilor concentraţiilor H+ indică valoarea cifrică a pH-ului, prin logaritmarea ecuaţiei de mai sus se poate obţine valoarea acidităţii actuale a acestui sistem tampon:

$$pH = pK + \log \frac{[NaHCO_3]}{[H_2CO_3]}$$

Aceasta este formula lui *Henderson-Hasselbalch* care, în urma introducerii valorilor fiziologice corespunzătoare, indică valoarea acidităţii actuale a plasmei şi a lichidelor biologice:

pH = 6,1 + 1,3 = 7,4

(cifra 6,1 este valoarea pK a acidului carbonic, iar 1,3 este logaritmul raportului bicarbonat/acid carbonic = 20/1). Reiese că, la un exces de 20 de ori al bicarbonatului, aciditatea actuală optimă a lichidelor biologice corespunde unui pH de 7,42.

Capacitatea tampon a sângelui exprimată prin valoarea acidităţii titrabile este relativ redusă, de circa 46 mmol/l, din care 26 mmol/l îi revin bicarbonaţilor (rezervei alcaline), iar restul de 20 mmol/l sistemului tampon Hb/HbO2 din interiorul hematiilor. În lichidele biologice funcţionează şi alte sisteme tampon [ca fosfaţii (Na_2HPO_4/NaH_3PO_4) şi proteinele], dar din cauza concentraţiilor lor molare mici, însemnătatea funcţională a acestora este redusă.

Capacitatea tampon a sângelui poate neutraliza produşii de degradare cu caracter acid numai pentru o scurtă perioadă. De exemplu, cantitatea de acid lactic, produsă de arderea a 12 g glucoză, consumă întreaga capacitate tampon a volumului sângelui circulant. Din acest motiv, capacitatea tampon a sângelui se epuizează rapid şi asigură numai neutralizarea imediată şi temporară a metaboliţilor acizi. Valoarea practic constantă a capacităţii tampon a sângelui se menţine totuşi prin regenerarea continuă a acesteia. Această regenerare se realizează prin două mecanisme, dintre care *mecanismul respirator* elimină excesul bioxidului de carbon prin expiraţia plumonară, iar *mecanismul metabolic* (renal) recuperează cantitatea consumată a bicarbonaţilor (rezervei alcaline).

5.3.4. Mecanismul pulmonar al reglării echilibrului acido-bazic

Marea capacitate a plămânilor, de compensare a acidității actuale și titrabile, reiese din faptul că, în urma unei alimentații fiziologice (3 000 kcal/zi) se formează zilnic în organism circa 500 g bioxid de carbon și 42 g H^+. Bioxidul de carbon ca produs final al arderii carbonului fiind un gaz neelectrolit, prezent în exces în lichidul interstițial și sânge, trece ușor prin membrane, inclusiv prin cea a hematiilor. În interiorul acestora și în prezența apei, sub acțiunea enzimei carboanhidrază, bioxidul de carbon se transformă în acid carbonic. Prin disocierea electrolitică a acestuia din urmă se pun în libertate ioni de HCO_3^- și H^+. Protonii se fixează temporar de molecula hemoglobinei reduse, care se comportă ca un acid slab, prin cedarea în schimb a ionilor de K^+ pentru neutralizarea bicarbonaților. Excesul de bicarbonați trece din hematii în plasmă, pe seama unui schimb reciproc cu clorurile. Acestea, cu învelișul lor hidratat introduc astfel în hematii cantități însemnate de apă, ducând la creșterea volumului eritrocitar și a valorii hematocritului în sângele venos.

Din sângele capilar al interstițiului alveolar pulmonar, oxigenul molecular (O_2) trece în plasmă și apoi în hematii. Hemoglobina redusă se oxigenează, devine mai acidă și capabilă să elibereze prin disociere protonii fixați, în schimbul refixării ionilor de K^+ cedați în sângele venos. Protonii eliberați formează cu bicarbonații acid carbonic, care sub acțiunea carboanhidrazei se descompune în bioxid de carbon și apă. Bicarbonații descompuși intraeritrocitar se înlocuiesc cu bicarbonații din plasmă, paralel cu ieșirea cantităților echivalente ale clorurilor. Aceasta înseamnă că în sângele arterial, pe de o parte bicarbonații plasmatici în exces se descompun în hematii, în bioxid de carbon și apă, iar pe de altă parte, din cauza ieșirii clorurilor puternic hidratate din hematii, volumul acestora se va micșora, paralel cu scăderea valorii hematocritului din sângele arterial. În sfârșit, gradul eliminării sau retenției bioxidului de carbon este condiționat de intensitatea respirației; hipoventilația duce la creșterea presiunii parțiale tisularo-sanguine a bioxidului de carbon (pCO_2), adică la manifestarea unei *acidoze respiratorii* prin *hipercapnie*, iar în urma unei respirații forțate se manifestă o *alcaloză respiratorie* prin *hipocapnie*.

5.3.5. Mecanismul metabolic al regenerării bicarbonaților consumați

Acesta funcționează la nivelul *tubilor renali distali* prin reacții metabolice cuplate cu schimburile ionice active între H^+ intracelular și Na^+ intratubular, respectiv prin difuziunea neionică a amoniacului (NH_3) din interiorul celulelor tubulare în lichidul tubular și transformarea lui prin fixarea unui proton, în ion de amoniu (NH_4^+). Pe seama fiecărui proton fixat poate fi reabsorbit și

transformat în bicarbonat, încă un ion de Na^+. În contrast cu moleculele neionizate ale amoniacului, membrana celulelor tubulare este impermeabilă pentru ionii de amoniu, din cauza caracterului lor de electrolit slab. Astfel, fiecare moleculă de amoniac excretată fixează câte un proton, reducându-se aciditatea urinii şi neutralizându-se acizii organici (acidul uric şi acidul oxalic), ca uraţi şi oxalaţi.

Ionii de H folosiţi pentru schimburile H/Na provin şi în acest caz din disocierea electrolitică a acidului carbonic, format sub acţiunea carboanhidrazei din bioxid de carbon şi apă. Ionii de H se excretă în lichidul tubular, fiind schimbaţi cu câte un ion de Na. Protonii excretaţi în lichidul tubular, pe de o parte transformă fosfaţii primari (Na_2HPO_2) în fosfaţi secundari (NaH_2PO_4) şi duc la creşterea acidităţii urinii; pe de altă parte ionii de Na^+ reabsorbiţi, împreună cu ionii de bicarbonat reţinuţi în celule, sunt eliminaţi spre sângele vaselor recte-peritubulare, făcând să crească astfel capacitatea sa tampon.

Capacitatea regeneratoare a rinichilor poate fi apreciată având în vedere faptul că, în urma consumării unui regim alimentar obişnuit, rinichii excretă prin urină în 24 de ore o cantitate de 20-30 mmol H^+ (acizi titrabili). Ca urmare, urina are o reacţie acidă, cu valorile acidităţii actuale între pH = 4,5 - 6,9. De remarcat că din cauza substanţelor tampon prezente în urină valoarea maximă a acidităţii urinare nu poate să coboare sub pH = 4,5, nici în cazul unei acidoze deosebit de grave. *Aciditatea titrabilă* a urinii – deci cantitatea absolută a acizilor excretaţi prin urină – poate creşte totuşi chiar şi peste 150 mmol/zi. Această valoare poate fi determinată uşor cu ajutorul titrării unui volum fix de urină, încălzită la 38°C, cu o soluţie de NaOH 0,1 N, în prezenţa indicatorului Töpfer, folosit şi pentru titrarea acidităţii gastrice.

5.3.6. Tulburările echilibrului acido-bazic

Orice modificare funcţională endogenă, sau acţiune exogenă care duce la scăderea spre *acidoză* sau creşterea spre *alcaloză* a acidităţii titrabile a sângelui şi a lichidelor biologice, face posibilă apariţia tulburărilor mai mult sau mai puţin grave ale funcţiilor celulare. Conform celor două mecanisme pulmonare şi metabolice ale reglării echilibrului acido-bazic se pot deosebi 5 feluri de dereglări: *acidoza respiratorie* şi *metabolică*, *alcaloza respiratorie* şi *metabolică*, precum şi *formele mixte* ale acestora. În fazele incipiente, fiecare formă a dereglărilor echilibrului acido-bazic este *compensată* din punct de vedere funcţional, adică nu duce la modificarea însemnată a acidităţii actuale (a valorii pH), nici la apariţia tulburărilor funcţionale. În cazul unor dereglări mai grave, tulburarea devine *manifestă*, solicitând intervenţia terapeutică potrivită şi imediată.

În cazul unei *acidoze metabolice*, creşterea conţinutului în sânge a unor acizi organici ficşi consumă capacitatea tampon (bicarbonaţii) cu formarea

sărurilor lor fixe şi a acidului carbonic. Ca urmare, scăderea cantităţii bicarbonaţilor plasmatici semnalizează fidel gravitatea acidozei. În schimb, în cazul unei *acidoze respiratorii*, creşterea acidităţii sângelui apare în urma unei retenţii de bioxid de carbon, cauzate de tulburarea respiraţiei. În urma creşterii cantităţii bioxidului de carbon, creşte şi cantitatea bicarbonaţilor în sânge, care în ciuda acidozei existente poate depăşi chiar şi limita superioară a valorilor normale.

Din caracterul mai mult sau mai puţin acid al produşilor de degradare, în contrast cu acidozele metabolice şi respiratorii, probabilitatea manifestării în organism a unei *alcaloze metabolice* este mult mai mică. Totuşi, ea poate apare în urma unor pierderi excesive de acid gastric (vărsături îndelungate) sau prin consumarea exagerată a bicarbonaţilor pentru scopuri terapeutice, cu creşterea marcantă a cantităţii rezervei alcaline în plasmă. O *alcaloză respiratorie* se poate manifesta din cauza unei hiperventilaţii spontane sau mecanice. În cazul acesta, în ciuda alcalozei evidente, din cauza hipocapniei, valoarea rezervei alcaline plasmatice poate fi uneori mult sub limita valorii normale inferioare. Modificările rezervei alcaline, în cursul diferitelor forme compensate şi manifeste ale tulburărilor echilibrului acido-bazic arată că valoarea acidităţii actuale (pH) şi valoarea cifrică a rezervei alcaline din plasmă nu reflectă într-o măsură suficientă starea echilibrului acido-bazic. Ca urmare, pe baza acestor parametrii, nici măsurile terapeutice nu pot fi stabilite cu exactitate. În dorinţa înlăturării acestui impediment Peer Astrup şi colaboratorii săi au realizat, în 1960, microinstalaţia cu ajutorul căreia pot fi determinaţi în câteva minute, din sânge, toţi parametrii importanţi ai acestui echilibru:

1) **Aciditatea actuală** reprezintă valoarea cifrică de pH (cantitatea în g/l a H^+) măsurabilă a sângelui. Concentraţia H^+ în grame pe litru poate fi exprimată şi în nanomol/l (de ex. valoarea pH = 7,4 este egală cu 50,1 nanomol/l H^+). Deşi utilizarea acestei forme de exprimare are numeroase avantaje, ea nu s-a răspândit încă în practică. Valoarea normală a acidităţii actuale a sângelui se situează între limite strânse: pH = 7,32 - 7,45, respectiv 47,8 - 35,4 nanomol H^+/l. Este de remarcat faptul că, deoarece gradul disocierii electrolitice a electroliţilor slabi scade paralel cu scăderea temperaturii, măsurătorile acidităţii actuale şi titrabile trebuie să fie efectuate totdeauna la temperatura constantă de 38°C.

2) **Presiunea parţială** a bioxidului de carbon (pCO_2), în amestecul de gaze în care se află, furnizează informaţii asupra stării funcţionale a mecanismului respirator al echilibrului acido-bazic. Ea poate fi determinată în mod direct, cu ajutorul unui electrod ionoselectiv sau poate fi citită din diagrama *Siggaard-Andersen*. Valoarea normală este de 53,2 bar (40 mm Hg) în sângele arterial şi de 59,9 bar (45 mm Hg) în cel venos.

3) **Bicarbonatul standard** exprimă conţinutul în bicarbonaţi al plasmei în urma echilibrării la 38°C cu un amestec de aer, care conţine şi bioxid de carbon într-o cantitate, la care valoarea pCO_2 să fie egală cu 53,2 bar (40 mm Hg). În asemenea condiţii se elimină diferenţele cauzate de modificările ocazionale ale respiraţiei. Valorile normale se situează între 22-28 mmol/l.

4) **Rezerva alcalină** (sau conţinutul total în bioxid de carbon al sângelui) se exprimă în mmol/l şi este egală cu acea cantitate de CO_2 care se degajă dintr-un volum de un litru de plasmă, în urma adăugării în exces a unui acid mai puternic decât acidul carbonic (de ex. acidul lactic). La început, după Donald Dexter Van Slyke, această valoare a fost exprimată în procente de volum (limitele normale între 55-60 vol %). Valoarea normală este de 25-26 mmol/l în sângele arterial şi de 27-29 mmol/l în cel venos.

5) **Bazele tampon** (*Buffer Base, BB*) reprezintă valoarea acidităţii titrabile a sângelui, adică suma tuturor componenţilor tampon fixatori de H^+, inclusiv conţinutul în hemoglobină al hematiilor. Acest parametru a fost creat tocmai pentru deosebirea modificărilor rezervei alcaline în cursul tulburărilor metabolice şi respiratorii. Valoarea normală este de 46 mmol/l, din care 26 mmol/l îi revin rezervei alcaline, 19 mmol/l hemoglobinei şi restul celorlalte sisteme tampon ale plasmei. Este de remarcat că valoarea bazelor (BB) poate să scadă şi în cazul unei anemii sau al unei hemoragii grave. În asemenea cazuri însă, valoarea rezervei alcaline este aproape normală şi echilibrul acido-bazic tulburat poate fi restabilit printr-o transfuzie şi nu prin administrarea bicarbonaţilor sau altor substanţe tampon.

6) **Excesul de baze** (*Base Excess, BE*) reprezintă diferenţa între valoarea măsurată în mmol/l a bazelor din tampon (BBA, A = actual) şi cea normală (BBN), conform formulei:

BE mmol/l = BBA mmol/l - BBN mmol/l

Valoarea normală a excesului de baze se modifică între 0 ± 2,2 mmol/l. O valoare negativă semnalizează scăderea (spre acidoză), una pozitivă, creşterea (spre alcaloză) cantităţii bazelor tampon (BB). Cunoscând valoarea excesului de baze şi a greutăţii corporale, cu ajutorul formulei lui K. *Mellemgaard* şi P. *Astrup*, se pot calcula cu uşurinţă cantităţile de bază sau de acid necesare pentru restabilirea echilibrului acido-bazic tulburat. Factorul 0,3 de multiplicare reprezintă proporţia volumului compartimentului de apă extracelular:

Bază sau acid mmol/l = BE x 0,3 x Kg corp

7) **Lacuna anionică** (*LA, Anion Gap*) indică în cazuri de acidoză metabolică excesul exprimat în mmol/l al acizilor ficşi, calculat din valorile ionogramei serului, prin scăderea sumei cantităţii clorurilor şi bicarbonaţilor (105 + 26 = 131) din suma valorilor sodemiei şi potasemiei (142 + 4 = 146). Valoarea normală a lacunei (146 - 131 = 15 mmol/l) se situează sub 15 mmol/l. Valorile mai mari de 17 mmol/l ale lacunei anionice semnalizează prezenţa unor acizi ficşi în plasmă, care sunt de origine metabolică (acid lactic, corpi cetonici) sau exogenă (salicilaţi). Absenţa lacunei anionice pledează, însă, pentru o pierdere de bicarbonaţi sau un exces de cloruri.

8) Valoarea cantităţii bicarbonaţilor potenţiali (BCP), exprimată în mmol/l, arată acea cantitate a rezervei alcaline, care se regenerează spontan în urma corectării terapeutice a dereglării echilibrului acido-bazic. Această valoare poate fi calculată prin scăderea sumei cantităţii clorurilor, a bicarbonaţilor standard şi a valorii lacunei anionice din valoarea în mmol/l a sodemiei:

BCP mmol/l = $[Na^+]$ - ($[Cl^-]$ + $[HCO_3^-$ stand.] + [LA] mmol/l)

Valoarea bicarbonaţilor potenţiali trebuie să fie totdeauna luată în considerare în cursul tratamentului stărilor de acidoză metabolică, în vederea evitării manifestării unei alcaloze iatrogene.

5.3.7. Aciditatea și osmoza

Între cei doi componenţi fundamentali ai homeostazei organismului, între metabolismul hidro-mineral şi echilibrul acido-bazic, există relaţii şi interacţiuni multiple. De exemplu, ionii de H^+ pot pătrunde prin schimburi ionice active din exterior în celule, dar se formează şi în ele. În comparaţie cu valoarea calculată a potenţialului electrochimic al H^+ (-90 mV), cea măsurabilă este de numai -30 mV. Cantitatea intracelulară a ionilor de H^+ este, deci, mai mică decât cea calculabilă pe baza ecuaţiei *Gibbs-Donnan*. Această diferenţă se explică prin existenţa şi funcţionarea unui *mecanism de pompă* care, pe baza unui consum de energie, elimină din celule excesul de protoni. S-a constatat că raportul cantităţii excretate din celule printr-un travaliu osmotic a Na^+ şi H^+ este de 4:1, ceea ce înseamnă că, prin funcţionarea ATP-azei Na^+/K^+ dependente, împreună cu fiecare 4 ioni de Na^+ eliminaţi va fi excretat şi câte un ion de H^+.

Legătura strânsă a metabolismului hidro-mineral şi a echilibrului acido-bazic se realizează prin funcţiile renale. Dinamismul acestei legături poate fi demonstrat prin prezentarea fenomenelor manifestate în cursul dezvoltării unei alcaloze metabolice. În urma unor vărsături îndelungate se pierd cantităţi însemnate de acid clorhidric (ioni de clor). Concomitent se instalează o hipocloremie, cu creşterea cantităţii bicarbonaţilor care înlocuiesc clorurile absente şi duc la apariţia unei alcaloze metabolice. La nivelul tubilor renali distali, reabsorbţia clorurilor şi a bicarbonaţilor este invers proporţională. Cu cât reabsorbţia tubulară a clorurilor este mai mică, cu atât se reabsorb în sânge mai mulţi bicarbonaţi. În asemenea cazuri ar fi nepotrivită restabilirea echilibrului prin administrarea intravenoasă a unui acid mai puternic decât acidul carbonic, deoarece în urma descompunerii oxidative a acestuia, alcaloza metabolică s-ar manifesta din nou. În schimb, singura soluţie potrivită pentru acest scop o constituie *restabilirea valorii cloremiei*, în urma căreia excesul de bicarbonaţi se elimină sub formă de bioxid de carbon prin plămâni şi alcaloza metabolică hipocloremică dispare. Ca urmare, este evident că în urma instalării unei hipocloremii se manifestă şi o alcaloză metabolică, care va fi cu atât mai gravă, cu cât valoarea cloremiei este mai mică.

5.3.8. Pierderile de sare și echilibrul acido-bazic

În cursul manifestării stărilor de pierdere de sare din cauza tulburărilor gastro-intestinale, renale sau a glandelor sudoripare, apar şi tulburări ale

echilibrului acido-bazic. Natura acidozică sau alcalozică a acestor tulburări este determinată de cantităţile pierdute ale ionilor de Na^+ şi Cl^-, precum şi de raportul acestor cantităţi. În cazul în care se pierd cantităţi mai mari de cloruri, se manifestă o alcaloză metabolică (de ex. alcaloza manifestată la bolnavii cardiaci cronici decompensaţi, în urma administrării excesive a diureticilor). În cazul în care predomină hiposodemia, în urma excesului clorurilor, se instalează o acidoză metabolică. În schimb, în cazurile în care se păstrează valoarea raportului de 140:100 între cantitatea sodiului şi a clorurilor plasmatice, nu se manifestă devierea echilibrului acido-bazic.

5.3.9. Potasemia și echilibrul acido-bazic

Modificările potasemiei influenţează în mod deosebit echilibrul acido-bazic. În cursul tuturor stărilor cu pierdere de potasiu, conţinutul scăzut în K^+ al lichidului extracelular şi al plasmei se înlocuieşte din celule. În cursul acestei înlocuiri, în schimbul fiecăror 3 ioni de K^+ ieşiţi din celule, pătrund – 2 Na^+ şi un H^+. Ca urmare, pe de o parte scade conţinutul în K^+ al celulelor, pe de altă parte creşte conţinutul lor în H^+ (acidoză intracelulară) pe seama scăderii extracelulare a cantităţii H^+, ducând la manifestarea unei alcaloze metabolice.

Această situaţie se stabileşte şi în celulele epiteliului tubular renal care, în ciuda alcalozei metabolice manifestate în sânge şi în lichidul extracelular, excretă în continuare printr-o *acidurie paradoxală* ioni de H^+ şi reţin ioni de bicarbonat în sânge. Ca urmare, în această formă hipopotasemică a alcalozei metabolice se excretă o urină cu reacţie acidă. Această stare se menţine şi se agravează continuu, până la readucerea la normal a potasemiei. Dar şi în asemenea cazuri ar fi nepotrivită încercarea echilibrării alcalozei prin perfuzarea soluţiei unui acid slab. În urma descoperirii şi înlăturării factorului cauzal, urmată de restabilirea potasemiei, se corectează spontan şi rapid echilibrul tulburat, prin reintrarea ionilor de K^+ în celule, respectiv prin ieşirea din celule a excesului de H^+.

5.4. Plasma sanguină

5.4.1. Volumul plasmatic, osmoza, conținutul mineral

Celulele organismelor superioare se găsesc într-un lichid – *mediu intern* – care le procură hrana şi în care îşi elimină produsele catabolismului. Compoziţiile sângelui şi ale lichidului interstiţial sunt apropiate datorită

schimburilor permanente ce au loc între ele. Sângele este, deci, parte din mediu intern cu caracteristici fizico-chimice foarte constante. Asupra eventualelor variaţii datorate funcţiilor organismului acţionează un complex de mecanisme, încât se poate realiza un echilibru stabil a mediului interior, condiţie esenţială a existenţei organismului uman.

Sângele este un lichid care conţine elemente figurate suspendate în mediul amorf – *plasma*. Ea se obţine astfel: sângele recoltat pe anticoagulant se separă într-un strat inferior, format din elemente figurate şi unul superior, limpede şi gălbui – plasma. Atât plasma, cât şi serul (stratul superior obţinut din sângele recoltat fără anticoagulant) constituie partea lichidă a sângelui, sunt asemănătoare între ele cu excepţia factorilor de coagulare şi a fibrinogenului ce se consumă în timpul coagulării şi nu se mai regăsesc în ser.

Plasma îndeplineşte numeroase funcţii şi anume:

– nutritivă, transportând ţesuturilor substanţe nutritive spre utilizare sau depozitare;

– imunologică, transportând complementul, anticorpii şi substanţele alexice;

– excretoare, eliminând reziduurile metabolismului celular;

– umorală, transportând hormonii şi vitaminele;

– de echilibrare electrolitică prin care ionii resorbiţi din alimente sau produşi în organism se vehiculează continuu între plasmă şi lichidul interstiţial;

– de echilibrare fluido-coagulantă, menţinând echilibrul hemostazei (datorită factorilor procoagulanţi şi anticoagulanţi ce-i conţine) şi echilibrul fibrinolizei (prin factorii profibrinolitici şi inhibitorii antifibrinolitici), cât şi realizarea homeostaziei hemostazei (prin menţinerea echilibrului dinamic al funcţiilor enumerate);

– reglator termic, conţinând apă şi înmagazinând căldura organelor emiţătoare de energie exotermă;

– reglator hidroosmotic, menţinând constantă presiunea datorită proteinelor ce le conţine şi permiţând schimbul permanent al apei între patul vascular şi spaţiile interstiţiale;

– reglator al pH-ului, păstrând constant echilibrul acido-bazic al sângelui şi al mediului intern prin sistemele tampon;

– reglator al tensiunii arteriale, umplând prin masa lor patul vascular şi menţinând tonusul mecanismelor.

Plasma îşi reglează funcţiile, stabileşte legăturile interorgane şi asigură unitatea funcţională a organismului.

Plasma este un lichid limpede, uşor gălbui datorită bilirubinei, cu gust uşor salin, cu densitate 1,02 (mai mică ca a sângelui total care este de 1,06) şi vâscozitatea relativă (în *vitro*) de 1,65-1,85 c.p.* (sângele total are vâscozitatea 4-4,5 c.p.). Ph-ul plasmei este 7,35, mărime ce este necesar să se menţină constantă pentru a nu afecta eritrocitele. Aceasta se realizează prin mecanisme legate de sistemele tampon din sânge.

* c.p. = centipoise (1 poise = $cm^{-1}gs^{-1}$)

Volumul plasmei nu poate fi despărţit de cel al sângelui total, deoarece primul condiţionează pe celălalt. Sângele fiind compus din elemente figurate şi plasmă, raportul dintre aceşti doi constituenţi dă raportul volumelor globulelor şi al plasmei în 100 ml sânge prin tehnica determinării hematocritului. În felul acesta se poate cunoaşte concentraţia globulelor în plasmă sau echilibrul dintre masa globulară şi cea plasmatică, mai fidel decât numărătoarea eritrocitelor, valoare utilă în diagnosticul unor sindroame ca cel de hidratare, deshidratare, şoc, hemoragie, colaps etc.

Pentru valorile volumelor absolute ale sângelui, plasmei şi globulelor se folosesc metode indirecte. Ele se referă plasmei sau globulelor, completând volumul total sanguin pe baza hematocritului. Pentru plasmă se utilizează metode cu coloranţi (Evans blue), polivinil pirolidonă, albumină marcată etc.

Volumul plasmei circulante, calculat din valoarea normală a hematocritului (45% elemente figurate, 55% plasmă), este de 1650 ml, ceea ce corespunde izovolemiei. Volumul sanguin este influenţat de unii factori fiziologici. Astfel, el creşte cu greutatea neliniar, exponenţial. Sexul influenţează volumul sanguin, în sensul că bărbaţii după pubertate au mai mult sânge ca femeile. Temperatura exterioară modifică volumul sângelui circulant, deoarece influenţează schimburile apoase ale acestuia cu lichidul interstiţial.

Cunoaşterea volumului sanguin este de mare importanţă clinică. Diminuarea sa duce la insuficienta irigaţie a organelor, oxigenare slabă şi hipoxie. Creşterea permeabilităţii capilare ce apare ca o consecinţă a acestora, transvazarea apei şi a proteinelor în lichidul interstiţial determină scăderea şi mai mare a volumului ce duce în final, dacă nu se intervine, la exitus. Creşterea volumului sanguin impune atât un efort mărit al cordului, cât şi al întregului organism, incidenţa accidentelor cardiace şi renale fiind foarte probabile în timp.

Osmoza implică trecerea unui solvent printr-o membrană semipermeabilă (permeabilă pentru solvent, nu şi pentru substanţa dizolvată) de la mediul cu concentraţie mai redusă la cel cu concentraţie mai crescută. Membranele organismului fiind permeabile nu numai pentru apă, ci şi pentru cei mai mulţi electroliţi dizolvaţi în ea, nu se încadrează perfect în noţiunea de membrane semipermeabile.

Cum în plasmă se găsesc în permanenţă hematii, dacă presiunea sa osmotică este mai mare decât cea a hematiilor, ele cedează apa şi se ratatinează. Invers, acestea primesc apa şi se umflă. În ambele situaţii, funcţia hematiilor este compromisă şi se poate ajunge la afectarea chiar a vieţii globulului. Doar constanţa presiunii osmotice plasmatice evită aceste fenomene împreună cu spaţiul interstiţial cu care spaţiul plasmatic face toate schimburile osmotice.

Presiunea osmotică a plasmei este mai mare ca a lichidului interstiţial datorită proteinelor pe care le conţine şi care se disociază în ioni difuzabili şi nedifuzabili. Ultimii au tendinţa să îndepărteze ionii difuzabili de acelaşi semn, atrăgând pe cei de semn contrar, aceasta determinând diferenţa de

presiune osmotică a plasmei faţă de cea a lichidului interstiţial. În plus, proteinele prezentând şi ele o presiune osmotică proprie – presiunea coloid osmotică – aceasta se adaugă la presiunea osmotică a plasmei. Apa ar trebui să treacă doar într-un singur sens, dar trecerea se face în ambele sensuri, datorită intervenţiei presiunii hidrostatice a sângelui din capilare la care este supusă plasma. În acest fel se produce la cele două capete ale capilarului, un schimb în ambele sensuri, ce asigură legătura sânge-ţesuturi şi invers şi constituie esenţa bunei funcţionări a organelor şi, deci, a existenţei organismului.

Punctul crioscopic al plasmei sanguine este de -0,56°C, ceea ce corespunde unei concentraţii osmolare de 0,303 osmol/l sau 303 mosmol/l (0,56 : 1,85 = 0,303). Reiese că această activitate osmotică este echivalentă cu o presiune de 6,723 bar (22,41 x 0,3).

Constituenţii anorganici sunt o clasă extrem de importantă a plasmei, ea cuprinzând apa, sărurile minerale şi gazele.

Apa este principalul constituent al plasmei ce dizolvă toate celelalte componente anorganice şi organice. Plasma conţine 90% apă, globulele fiind relativ sărace în component hidric (65%). Dacă apa plasmatică este aproape apa sângelui în totalitate, se poate socoti drept apa circulantă intravasculară (5% din greutatea corpului). Apa circulantă intravasculară face legătura dintre mediul extern şi intern şi este zona cea mai solicitată investigaţiilor şi terapeuticii. Apa plasmatică este liberă, transportoare, devenind mediu dispers, de diluţie, de disociere şi solvent care ascultă de legile sale fizice. Supusă continuu la variaţii prin aport de substanţe din alimentaţie şi la excreţii tisulare, apa plasmatică rămâne constantă, datorită rinichiului, în special.

Sărurile minerale. Electroliţii plasmei formează preponderent scheletul de susţinere a apei intravasculare în cadrul apei extracelulare. Ei îndeplinesc în organism diverse funcţii: au rol esenţial în compoziţia celulelor; apar în compoziţia fermenţilor respiratorii, enzimelor şi hormonilor; intră în constituţia scheletului; reglează permeabilitatea membranelor şi excitabilitatea neuro-musculară; joacă rol în osmoza apei, produc presiunea osmotică şi menţin echilibrul osmotic al plasmei; reglează echilibrul acido-bazic al plasmei.

Fiind dizolvate în apă, sărurile minerale se găsesc în plasmă sub formă de ioni. Se pot face, legat de echilibrul osmotic extracelular, următoarele observaţii: există o neutralitate electrolitică a plasmei cu a lichidului interstiţial; analogia structurii osmotice a plasmei cu a lichidului interstiţial permite schimburi ionice între aceste două componente ale compartimentului osmotic extracelular; rolul proteinelor plasmatice prin disociere permite echilibrarea balanţei ionice în sensul electroneutralităţii plasmei.

5.4.2. Oligoelementele din plasma sanguină: fierul, cuprul, zincul, cobaltul, manganul

Fierul

Nevoia de fier a organismului se datorează rolului important pe care acest metal îl joacă în energia metabolismului tuturor vieţuitoarelor. În timp ce sursa primară de energie în toate cazurile este energia solară captată de plantele verzi prin fotosinteză, energia imediată solicitată în multe celule vii este procurată prin oxidarea substanţelor organice de către oxigenul molecular. În procesele vieţii asociate cu aceste oxidări, două tipuri de proteine au o importanţă fundamentală: enzimele redox specifice care catalizează reacţiile oxidative şi proteinele specializate pentru transportul de oxigen la celule şi ţesuturi, care se află în sângele organismelor evoluate cum este omul. Ambele tipuri de proteine solicită un metal pentru îndeplinirea activităţii biologice. În această funcţie sunt implicate, în special, două metale: fierul şi cuprul. Pentru om transportul de oxigen în sânge este efectuat de hemoglobină, o proteină care conţine fier. Multe animale inferioare au ca transportor de oxigen în sânge o cupro-proteină, hemocianina. Cuprul este un component esenţial în multe enzime redox la toate organismele, inclusiv la om.

Tabelul 20

Clasele importante de proteine care au în structura lor fier

Proteine	Hem (H) sau nonhem (N)	Funcţia
Hemoglobina, mioglobina	H	Transport de O_2
Hidroxiperoxidazele (catalaze, peroxidaze)	H	Enzime cu substrat H_2O_2
Citocromii	H	Transportori de electroni
Citocrom C oxidaza (această enzimă conţine şi Cu)	H	Oxidază terminală
Flavoprotein-dehidrogenazele şi oxidazele (nu toţi membrii din această clasă sunt Fe-proteine)	N	Enzime oxidante
Oxigenazele (nu toţi membrii din această clasă sunt Fe-proteine; o oxigenază – triptofan 2,3 dioxigenaza – este hem-proteină)	N	Enzime care catalizează încorporarea O_2 în substrate
Feredoxina	N	Transportor de electroni
Hemeritina	N	Transportor de O_2
Transferinele (sânge, albuş de ou, lapte)	N	Transport, stocaj
Feritina	N	Transport, stocaj

Numărul proteinelor care conţin fier (tabelul 20) este mult mai mare şi cuprinde multe clase care nu au fost menţionate în tabel. De ex: citocromii şi flavoproteinele reprezintă un număr mare de proteine distincte. În plus, proteine cu aceeaşi funcţie ca hemoglobina şi citocromul c au adesea variaţii multiple de specie şi chiar variaţii genetice în specia respectivă. În multe proteine care conţin fier, metalul este încorporat în gruparea prostetică hem, legat de proteină, dar sunt de asemenea un număr mare de proteine nonhem. Unele proteine care conţin fier au în organism un rol dublu: transport şi stocaj.

Metalele cele mai frecvent găsite în structura transportorilor de O_2 şi a enzimelor redox sunt fierul şi cuprul. Aceste metale, aşa-numite „metale de tranziţie" sunt un grup de elemente care au proprietăţi chimice ce favorizează rolul lor în aceste proteine. Metalele de tranziţie au în general mai mult decât o valenţă relativ stabilă. De ex: în cazul fierului Fe^{2+} şi Fe^{3+}. În acest caz, metalele pot funcţiona în procesele redox prin schimbarea valenţei fie prin reducere de către un substrat organic, fie prin reoxidare cu O_2. În timp ce ionii metalici favorizează complexe puternice numai cu anionii sau cu capătul negativ al moleculelor dipolare, ionii metalelor de tranziţie inclusiv Fe^{2+} şi Cu^{+} pot lega în complexe O_2, care este o moleculă neutră simetrică. Aceste complexe devin posibile datorită structurii electronice ale ionilor de Fe^{2+} şi Cu^{+}, ca şi a celei de O_2. Proprietăţile redox şi cele de formare a complexelor în cazul metalelor de tranziţie sunt influenţate de natura chimică şi aranjamentul spaţial al grupelor de legare, aşa încât fierul poate avea schimbări surprinzătoare de funcţie.

Nevoia de fier în dietă variază mult în funcţie de vârstă şi de circumstanţe. În perioada de creştere, sarcină şi lactaţie, când cererea pentru sinteza hemoglobinei este crescută, este necesar un supliment de fier în dietă. La persoanele adulte sănătoase, deficitul de fier este puţin probabil, în afară de cazul când s-a produs o pierdere de sânge. O excepţie este posibilitatea ca deficienţa de fier să fie rezultatul malabsorbţiei din tractul gastro-intestinal, cum se întâmplă după rezecţia chirurgicală a unei porţiuni de stomac şi intestin subţire sau la bolnavii cu boli caracterizate prin malabsorbţie. La femei, media de pierdere de sânge în timpul perioadei menstruale este de aprox. 32 mg fier, cantitate care poate fi recuperată cu uşurinţă din dietă. Când pierderea de sânge în perioada menstruală este excesivă, rezultă o anemie cu deficit de fier care se poate corecta prin aportul suplimentar a 100 mg fier zilnic, sub formă de sulfat feros. După menopauză solicitarea de fier este aproape neglijabilă. Pentru utilizarea fierului la sinteza hemoglobinei sunt necesare urme de cupru. Cantitatea de fier necesară organismului variază în funcţie de vârstă, astfel: nou-născuţi: 6-15 mg; copii de 1-3 ani: 15 mg; copii de 3-10 ani: 10 mg; copii peste 10 ani şi adulţi: bărbaţi de 10-12 ani: 10 mg; 12-18 ani: 18 mg; după 18 ani: 10 mg; femei de 10-55 de ani şi în timpul sarcinii şi lactaţiei: 18 mg; femei după 55 de ani: 10 mg.

Conţinutul în fier a diferitelor alimente variază foarte mult. Chiar în acelaşi fel de hrană pot fi variaţii în conţinutul de fier, în funcţie de pregătirea alimentelor. Cele mai bune surse pentru obţinerea fierului din dietă sunt:

ficatul, inima, rinichiul şi splina. Alte surse sunt: gălbenuşul de ou, peştele, nucile, smochinele, mazărea, spanacul şi fulgii de ovăz. O trăsătură specifică şi posibil unică a metabolismului fierului este aceea că se produce într-un sistem virtual închis. În condiţii normale, o cantitate foarte mică de fier din dietă este absorbită şi cantitatea excretată prin urină este minimă. Deoarece nu este o cale pentru eliminarea excesului de fier, absorbţia din intestin trebuie să fie controlată pentru a împiedica acumularea sa în ţesuturi în cantităţi toxice. Din dieta obişnuită sunt ingerate zilnic 10-20 mg fier, dar mai puţin de 10% din această cantitate este absorbită. După administrarea unei doze test cu izotopi de fier (^{59}Fe) numai 5% din cantitate a fost găsită în sânge, 87% a fost eliminată în fecale şi 8% nu a fost detectată. Nou-născuţii şi copiii absorb un procent de fier mai mare din alimente decât adultul, de aceea deficitul de fier la copii poate fi atribuit adesea unei diete inadecvate. O mare parte din fierul alimentar este sub formă ferică (Fe^{3+}), sub formă de hidroxid de fier sau sub formă de compuşi organici ferici. În mediul acid, aceşti compuşi sunt scindaţi sub formă de ioni ferici sau compuşi organici de fier cu legături slabe. Sucul gastric acid şi acizii organici din alimente sunt foarte importanţi. Substanţele reducătoare din alimente, grupările SH (cisteina sau acidul ascorbic convertesc ionii de fier aflaţi sub forma ferică, la forma redusă (feroasă). Sub această formă fierul este mai solubil şi de aceea poate fi absorbit mai uşor.

La naştere copilul are 250 mg fier de la mamă. În primele luni de viaţă primeşte o hrană cu deficit de fier şi absoarbe o cantitate foarte mică. În timpul creşterii, copilul absoarbe aproximativ 0,5 mg zilnic în exces faţă de cel pierdut, pentru a ajunge la concentraţia de fier a adultului. Adultul păstrează constantă cantitatea de fier din organism prin conservarea eficientă a acestui element, prin controlul balanţei de absorbţie şi eliminare. Un bărbat adult pierde zilnic 1 mg de fier, cea mai mare parte prin descuamare epitelială şi secreţiile din intestin şi piele. O femeie adultă pierde în mod normal o cantitate adiţională de 30 mg fier lunar şi aproximativ 800 mg cu fiecare sarcină. Acest deficit este echilibrat prin absorbţia unei cantităţi echivalente de fier. Din contră, absorbţia unei cantităţi excesive de fier din dietă fără o eliminare corespunzătoare produce sideroza şi deteriorarea ţesuturilor. Înainte se credea că fierul din organism este controlat numai prin reglarea absorbţiei, iar excreţia joacă un rol pasiv. Cu toate acestea, multe celule conţin fier, ceea ce arată că acesta este stocat în organism. Deci, pierderea obligatorie de celule în piele şi intestin ca şi secreţiile (bila, saliva şi sebum) furnizează o eliminare limitată şi selectivă a fierului în organism. În plus există o pierdere zilnică normală prin fecale (0,2 mg fier), o cantitate mică este excretată prin urină (aprox. 0,1 mg), în afară de cazul în care un bolnav prezintă o hemoliză intravasculară care poate produce o eliminare de fier prin urină de 10-20 mg/zi. În mod normal fierul este înlocuit prin absorbţie din dietă (1-2 mg zilnic). Studii recente au arătat că fierul eliminat este la fel de important ca cel absorbit, dar pentru menţinerea echilibrului, absorbţia joacă un rol reglator mai activ. Mecanismul exact de reglare a transferului de fier prin mucoasa intestinală nu este bine cunoscut, dar au fost investigaţi mulţi factori

care influenţează absorbţia. Sunt trei localizări anatomice pentru studiul factorilor de reglare: intraluminal, celulele absorbante ale duodenului şi celulele corpului.

Absorbţia fierului se produce mai ales în stomac şi duoden. Fierul din dietă trebuie să fie expus suprafeţei de absorbţie un interval de timp suficient de mare şi într-o formă care să permită absorbţia cantităţii de fier necesară organismului. Factorii care afectează absorbţia sunt:

– Starea rezervelor de fier. Absorbţia este crescută atunci când este un deficit de fier şi descreşte când este o încărcare de fier. În anemiile cu deficit de fier, absorbţia poate creşte de 2-10 ori peste limitele normale.

– Factorii care stimulează eritropoieza măresc absorbţia de fier, în timp ce descreşterea producerii de hematii atrage o diminuare a absorbţiei.

– O dietă bogată în fosfaţi produce scăderea absorbţiei de fier, întrucât compuşii de fier şi fosfat sunt insolubili, în schimb o dietă foarte săracă în fosfaţi creşte considerabil absorbţia de fier. De asemenea oxalaţii interferă cu absorbţia de fier.

Nu tot fierul furnizat de dietă este absorbit. Se pare că există un control al absorbţiei în intestin, deşi mecanismul exact nu este încă bine lămurit. Potrivit uneia dintre teorii, „blocarea mucoasei", apoferitina, o proteină care leagă fierul, este un factor de control. Fierul sub formă feroasă (Fe^{2+}) din celulele mucoase ale intestinului este oxidat la forma ferică (Fe^{2+}) şi apoi combinat cu apoferitina pentru a da feritina (forma de stocare a fierului). Feritina este o proteină care conţine aprox. 28% din cantitatea de fier raportată la greutate. Se crede că această capacitate a apoferitinei de a lega fierul limitează absorbţia lui. Atunci când apoferitina este saturată cu fier, stocajul ulterior de fier în intestin sub formă de feritină nu se mai produce. Conţinutul normal de apoferitină din celulele mucoase este mic, dar se observă o creştere semnificativă în urma administrării de fier. Mai mult, administrarea de fier, împiedică absorbţia ulterioară timp de 12-24 h. Este evident faptul că mai există un sistem de transport activ al fierului independent de feritină şi de variaţiile în activitatea sistemului care reglează absorbţia. Existenţa acestui al doilea sistem de reglare independent de feritină a fost pus în evidenţă de Dowdle (1960) prin experienţe pe şoareci cu defect genetic congenital în absorbţia fierului, legat de cromozomul x.

Fierul din organism este eliminat prin fecale, proporţional cu starea de saturare a organismului. Persoanele cu supraîncărcare de fier pot rămâne cu balanţa negativă, în aşteptarea restabilirii unui conţinut de fier normal. Această excreţie selectivă este limitată la câteva mg zilnic.

Deşi o cantitate mică de fier poate fi absorbită prin multe porţiuni ale intestinului, duodenul este locul cel mai eficient pentru absorbţie şi rămâne legat de solicitările organismului pentru fier. Animalele cu deficit de fier, măresc suprafaţa absorbantă a intestinului şi pot absorbi o cantitate semnificativă de fier în jejun.

Transportul fierului în plasmă. Fierul eliberat din stocajul sub formă de feritină este redus la forma feroasă şi părăseşte intestinul pentru a intra în

plasmă. Este posibil ca scăderea presiunii de oxigen în sânge să crească activitatea celulelor mucoasei intestinale care transferă fierul în plasmă. În prezenţa CO_2 fierul din plasmă formează un complex cu o beta globulină cunoscută ca transferină sau siderofilină, care transportă ionii metalici. Transferina este o glicoproteină care conţine: hexoză, hexozamină, acid sialic şi probabil fucoză. Jamieson (1965) a investigat structura glicopeptidică a transferinei umane.

După cum am văzut mai sus, fierul care intră din intestin în circuitul sanguin este în special sub forma feroasă (Fe^{2+}). În plasmă Fe^{2+} este oxidat rapid la forma ferică Fe^{3+} şi este apoi încorporat într-o proteină specifică, ce leagă fierul: transferina. Această proteină poate lega doi atomi de Fe^{3+} pe molecula de proteină şi formează un complex proteină-Fe^{3+} de culoare roşie. Dacă fierul sub forma feroasă este adăugat la proteină (apotransferină), se solicită oxigenul pentru a forma complexul roşu şi viteza de formare a culorii depinde de viteza oxidării Fe^{2+} la Fe^{3+} de către oxigenul molecular. În condiţii normale, aproape tot fierul legat în transferină este preluat rapid de măduva osoasă. Se pare că numai reticulocitele sunt capabile să utilizeze Fe^{3+} legat de transferină, deşi atât reticulocitele, cât şi hematiile mature pot prelua Fe^{3+} liber. Deci transferina sustrage într-un fel fierul din plasmă în celulele care produc hemoliza. Osaki şi colaboratorii săi (1966) au găsit că ceruloplasmina, o cuproproteină care se găseşte în plasmă, exercită o activitate catalitică de conversie a Fe^{2+} în Fe^{3+} şi astfel favorizează viteza de încorporare a fierului în transferină. Conţinutul normal al proteinelor din plasmă care leagă fierul este la bărbaţi, 120-170 μg/100 ml şi la femei, 90-120 μg/100 ml. Capacitatea totală de legare a fierului este aproximativ aceeaşi la ambele sexe: 300-360 μg/100 ml. Acest fapt arată că numai aprox. 30-40% din capacitatea serului de a lega fierul este folosită pentru transportul lui şi că siderofilina nesaturată cu fier este de aprox. 60-70% din total. În anemiile cu deficit de fier, capacitatea plasmei de a lega fierul este mică, în schimb capacitatea totală de legare a fierului tinde să crească, rezultând o mărire peste normal a fracţiunii nesaturate. În bolile hepatice, atât fierul legat, cât şi capacitatea totală a plasmei de legare a fierului pot fi scăzute, aşa încât raportul dintre capacitatea totală de legare a fierului şi fracţiunea nesaturată nu este semnificativ alterată de la valoarea normală. Cantitatea de fier legat variază în plasmă cu peste 60 μg/100 ml în decurs de 24 h. Valorile cele mai scăzute sunt noaptea şi cele mai ridicate sunt în primele ore ale zilei. Imposibilitatea rinichiului de a excreta fierul se datorează probabil prezenţei lui în plasmă sub formă de compuşi proteici care nu sunt filtrabili prin glomeruli. Pierderea fierului prin urină se poate produce în proteinurie. De ex: în nefroză este excretat mai mult de 1,5 mg fier zilnic împreună cu proteina în urină.

Sunt doi factori corporali importanţi care stimulează absorbţia de fier: viteza eritropoiezei şi stocurile de fier din ţesuturi. Producerea accelerată de hematii, corelată cu o sângerare masivă, hemoliză sau hipoxie, are ca urmare o creştere a absorbţiei de fier. Spre deosebire de aceasta, o eritropoieză diminuată cum se produce în inaniţie, transfuzia masivă sau revenirea la

nivelul mării de la altitudini mari scade absorbţia de fier. Acest fapt confirmă postulatul că hematiile sunt un factor de stimulare care acţionează ca un mesager la intestin, pentru a mări absorbţia de fier. Totuşi o absorbţie de fier mare continuă la persoanele cu deficit de fier mult timp după ce hemoglobina ajunge la concentraţia normală şi persistă până ce stocurile de fier sunt refăcute. În plus, la unii bolnavi cu ciroză sau anemie sideroblastică hipocromă, absorbţia de fier este crescută fără ca eritropoieza să fie accelerată sau stocurile de fier golite. La aceşti bolnavi, creşterea absorbţiei pare să fie legată de creşterea turnoverului fierului. Producerea accelerată de hemoglobină sărăceşte stocul de fier şi atunci fierul labil din ţesuturi poate fi un factor reglator. Dacă luăm în considerare receptorii tisulari pentru fier, absorbţia crescută a fierului va continua până ce aceşti receptori sunt saturaţi. Surplusul de fier devine disponibil pentru încorporarea în celulele intestinale pentru a inhiba absorbţia şi a creşte excreţia. Hemocromatoza (încărcarea masivă cu fier generalizată) ar fi în acest caz fie o dereglare a acestor receptori tisulari, fie o incapacitate a organismului de a utiliza fierul corect.

Factorii corporali sunt cei mai importanţi reglatori ai absorbţiei de fier. Totuşi calea prin care ei informează duodenul să transfere în plasmă cantitatea de fier necesară nu este cunoscută. Unii hormoni ca eritropoietina, tiroida şi extractele pituitare măresc absorbţia de fier.

În condiţii clinice, deficienţa de fier este influenţată în special de malnutriţia co-existentă, infecţii sau particularităţi constituţionale. Cu toate acestea, deficienţa de fier (clinică şi experimentală) are multe trăsături comune:

a) Anemia hipocromă cu creşterea numărului de precursori eritroblastici imaturi în măduvă şi mai frecvent scăderea numărului de hematii decât microcitoza.

b) Altă caracteristică este reducerea produşilor de scindare a hemoglobinei reflectată în serul foarte clar (scăderea concentraţiei de bilirubină) şi o urină anormal de decolorată (conţinând o cantitate foarte mică de urocrom B şi urobilină).

c) Altă caracteristică este deteriorarea tuturor ţesuturilor proliferatoare (în special mucoase), atrofierea papilelor glosei, ulceraţie esofagiană şi spasm (sindromul Plummer-Vinson), sau perturbarea dentiţiei. De asemenea se poate atrofia mucoasa gastrică cu hipo- sau hiperclorhidrie secundară. Este afectată creşterea părului, pielea este uscată şi fisurată. Creşterea unghiilor este în special afectată cu fisuri şi îngroşări transversale şi longitudinale. Adeseori se întâlneşte atrofia mucoasei nazale (ozena) ca urmare a deficienţei de fier.

d) Cel mai pregnant simptom psihologic este oboseala mentală, deficit de concentrare, scăderea energiei şi istovirea rapidă.

Biochimic este o reducere moderată până la reducerea pronunţată a concentraţiei de fier, în schimb cantitatea de transferină este mare. Principala schimbare în metabolismul fierului este pierderea de fier din plasmă, creşterea preluării de către măduvă şi stocajul mai mare în eritrocite. În ceea

ce priveşte metabolismul porfirinei, în eritrocite se acumulează protoporfirina neesenţială. În deficienţa de fier este de asemenea o creştere a excreţiei urinare a altor precursori ai hemului ca acidul delta-amino-levalinic şi a coproporfinemiei.

Factorii care produc dereglarea fierului sunt: perturbarea încorporării fierului şi a utilizării lui în moleculele de hemoglobină; lipsa substanţelor care favorizează absorbţia de fier; prezenţa substanţelor care limitează absorbţia (mucus, acid lactic etc.); deficienţa absorbţiei de fier produsă de dereglări gastro-intestinale sau intestinale; deficitul de fier transmis de la mamă la copil; deficitul de fier din dietă; mărirea solicitării de fier în timpul creşterii şi/sau formării de hematii; pierderea de fier la femei (menstruaţie, sarcină, lactaţie); pierderea de fier produsă de hemoragie; stocajul anormal de fier în SRE activat, datorită infecţiei sau tumorilor maligne.

Cuprul

Funcţiile acestui element esenţial nu sunt încă bine cunoscute. Cuprul este un constituent al unor enzime, sau este esenţial în activitatea lor. Aceste enzime includ citocromul, citocrom-oxidaza, catalaza, tirozinaza, monocrom-oxidaza şi ascorbic-oxidaza ca şi uricaza care conţine 550 μg cupru pe g de proteină-enzimă. Asemănător fierului, cuprul este necesar pentru sinteza de hemoglobină. O proteină care conţine cupru, eritrocupreina, a fost găsită în celulele roşii ale sângelui. În contrast cu ceruloplasmina, o cuproproteină din plasmă (colorată în albastru), eritrocupreina este o proteină aproape incoloră care conţine 2 atomi de cupru pe moleculă şi are o greutate moleculară de aprox. 33 000 daltoni. Adultul normal conţine în globulele roşii ale sângelui aprox. 30-36 mg de eritrocupreină pe 100 ml celule. Conţinutul în cupru a acestor celule este de 93-114 μg/100 ml. Eritroproteina conţine cel puţin 3,2 μg cupru pe mg proteină.

Cerebrocupreina este o cupro-proteină izolată din creierul uman de Porter & Folch (1959). Această proteină diferă de eritrocupreină (şi de ceruloplasmină) prin reacţia directă a cuprului cu dietilditiocarbamatul.

Alte funcţii ale cuprului includ rolul său în formarea măduvei şi în menţinerea mielinei în sistemul nervos. Hemocianina este un complex cupru-proteină din sângele unor nevertebrate unde acesta funcţionează ca un transportor de oxigen asemănător hemoglobinei. Corpul omului adult conţine 100-150 mg cupru din care aprox. 64 mg se găsesc în muşchi, 23 mg în oase şi 18 mg în ficat, care este organul cu cea mai mare concentraţie de cupru. Este interesant faptul că în ficatul fetal, concentraţia de cupru este de 5-10 ori mai mare decât cea găsită în ficatul adultului. Atât hematiile, cât şi serul conţin cupru, dar conţinutul în cupru al hematiilor este constant, în timp ce în ser variaţia este de aprox. 90 μg/100 ml.

Cupru seric este prezent în 2 fracţiuni distincte:

a) Cuprul "direct reactiv" este fracţiunea care reacţionează direct cu dietilditiocarbamatul, reactivul folosit pentru determinarea colorimetrică a cuprului. Acest cupru este legat slab de albumină şi reprezintă forma de transport.

b) Cea mai mare parte din cupru seric (96%) este legată de o alfa globulină; de aceea, pentru determinarea cuprului seric este necesar să tratăm serul cu acid clorhidric pentru a-l elibera din forma legată de globulină şi apoi să reacţioneze cu reactivul de culoare.

Ceruloplasmina este o proteină care leagă cupru din ser sau plasmă. Aceasta are o greutate moleculară de aprox. 151 000 daltoni şi conţine 0,34% cupru, sau 8 atomi de cupru pe mol. Plasma normală conţine aproximativ 30 mg ceruloplasmină pe 100 ml. Absorbţia maximă este la 610 nm. După Holmberg şi Laurell (1948) această cupro-proteină acţionează ca o enzimă (o polifenol oxidază). Ea mai poate funcţiona ca oxidant al fierului plasmatic pentru a-i permite acestuia să se lege de transferină.

Metabolismul cuprului. Experienţele au fost efectuate cu ajutorul cuprului marcat (^{64}Cu). Imediat după ingerare, cuprul este legat de albumina din plasmă; 24 h mai târziu o mare parte din această cantitate a fost găsită în fracţiunea globulinei, asociat cu ceruloplasmina. Deoarece cuprul din plasmă este legat de proteină, nu este excretat uşor în urină, cea mai mare parte fiind eliminată prin intestin. Animalele cu dietă deficitară în cupru pierd în greutate şi mor. Anemia hipocromă microcitică severă nu este cauza morţii, deoarece anemia cu deficit de fier nu este fatală. Aceasta sugerează rolul cuprului în corp în afara metabolismului hematiilor. Acest rol adiţional al cuprului este legat de activitatea enzimelor de oxido-reducere în ţesuturi, cum este sistemul citocrom. A fost pusă în evidenţă legătura dintre metabolismul cuprului şi fierului. În prezenţa unei deficienţe de cupru, deplasarea ionilor de fier de la ţesut la plasmă este scăzută şi rezultă o scădere a concentraţiei de fier (hipoferimie). Cuprul favorizează absorbţia ionilor de fier din tractul gastro-intestinal.

Experienţe făcute pe câini care au avut un regim alimentar lipsit de cupru au arătat dereglări ale metabolismului sistemului osos, deformări ale oaselor, fracturi, anemie pronunţată şi încărunţirea părului, în comparaţie cu lotul martor. Boala Wilson (degenerarea hepatolenticulară) este asociată cu dereglarea metabolismului cuprului. În această boală, ficatul şi nucleul lenticular din creier conţin cantităţi anormal de mari de cupru. În urină este o excreţie excesivă de cupru în timp ce în plasmă este o cantitate mică de cupru şi de ceruloplasmină. Se produce de asemenea o aminoacidurie generalizată. La bolnavii cu boala Wilson se observă o absorbţie mare de cupru din intestin. Dacă depozitarea cuprului în ficat devine excesivă se poate instala ciroza. Acumularea în rinichi poate duce la mărirea deteriorării tubilor renali şi creşterea excreţiei urinare de aminoacizi, peptide şi ocazional glucoză. Earl (1954) a considerat că boala Wilson se caracterizează prin deteriorarea sintezei de ceruloplasmină, sau a unui defect al încorporării cuprului în globulina care îl leagă. Rezultatul este că o cantitate mare de cupru liber se combină anormal cu proteine din creier şi ficat. Eliminarea excesivă a cuprului prin urină este de asemenea rezultatul cantităţii anormale de cupru liber. În mod normal cuprul este legat la ceruloplasmină 24 h după

ingestie, în timp ce la bolnavii cu boala Wilson, cupru este încă asociat cu albumina în acest timp.

Organismul uman adult solicită 2,5 mg cupru zilnic. Pentru copii nevoia zilnică este de aprox. 0,05 mg/kg corp. Cantitatea necesară este furnizată de dietă.

Zincul

Acesta este un element structural al enzimei carboxipeptidaza şi participă direct la activitatea catalitică a enzimei. De asemenea zincul este strâns asociat cu multe alte enzime ca alcool dehidrogenaza (care conţine un atom de zinc pe molecula de proteină enzimatică) sau carbon anhidraza. Insulina conţine zinc şi de aceea este important să observăm că pancreasul diabeticilor conţine numai 1/2 din cantitatea de zinc normală. Zincul conţinut în leucocitele persoanelor sănătoase este de $3,2 \pm 3 \times 10^{-10}$ μg/milion celule, în timp ce leucocitele bolnavilor de leucemie conţin numai 10% din cantitatea normală. Ameliorarea temporară a procesului leucemic este însoţită de creşterea conţinutului de Zn către valorile normale. Deoarece leucocitele nu conţin anhidrază carbonică, funcţia zincului în aceste celule nu este cunoscută. În celulă, metalul este strâns legat de proteină şi se găseşte în proporţie constantă: 82-117 μg zinc pe g de proteină. Deşi se crede că zincul este un element esenţial se cunoaşte puţin despre solicitările lui. Cantitatea necesară de 0,3 mg/kg zilnic este obţinută cu uşurinţă din dietă, deoarece conţinutul în zinc al alimentelor este aproximativ acelaşi ca al fierului. A fost semnalată deficienţa de zinc la pacienţii cu ciroză Laennec (post alcoolică) la care concentraţia medie de zinc este de 66 ± 19 μg/100 ml ser (valorile normale sunt 120 ± 19 μg/100 ml ser). La aceşti bolnavi eliminarea de zinc prin urină este crescută. La necropsie s-a constatat că ficatul bolnavilor care au murit de ciroză are o concentraţie de zinc mult mai mică decât al celor care au murit de alte boli decât cele hepatice. Se presupune că deficienţa de zinc la bolnavii cu ciroză se datorează factorilor secundari legaţi de boală, care împiedică absorbţia normală de zinc. Datorită importanţei zincului în activitatea unor enzime, se presupune că deficitul de zinc produce o schimbare biochimică semnificativă a substratului folosit de enzimă. Un astfel de substrat este alcoolul al cărui rol în etiologia şi exacerbarea cirozei este cunoscut.

Cobaltul

Acest element intră în structura vitaminei B_{12}. Deficitul de cobalt afectează formarea sângelui. Anemia nutriţională a viţeilor şi oilor care au primit o hrană cu deficit de cobalt a fost tratată cu cobalt. Microorganismele din rumenul acestor animale folosesc cobaltul pentru sinteza vitaminei B_{12}, în consecinţă un deficit de cobalt are ca rezultat diminuarea sintezei de vitamina B_{12}, unul dintre factorii importanţi în prevenirea anemiei. Preparatele cu cobalt se folosesc în tratarea anemiei la copii. Când acest element este conţinut în cantitate mare în alimentele animalelor de experienţă (şoareci) sau este injectat, se produce un exces de hematii (policitemie).

Clorura de cobalt administrată la om, produce de asemenea o creştere a numărului de hematii în sânge. Cobaltul este eliminat rapid şi aproape complet din organism prin rinichi, lucru pus în evidenţă cu ajutorul izotopilor.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

Manganul

De obicei, dieta furnizează aprox. 4 mg de mangan pe zi. Această cantitate este în exces faţă de cea necesară omului. Animalele de experienţă au arătat că acest element este esenţial, dar nu există o evidenţă a deficienţei de mangan la om. La păsări deficienţa de mangan poate produce o deteriorare a tendoanelor.

Cantitatea totală a manganului din organism este de aproximativ 10 mg. Rinichiul şi ficatul sunt locurile unde este stocat. În sânge, valorile de 4-20 μg/100 ml sunt considerate a fi în limite normale. O mare parte din mangan este excretată prin bilă, lucru pus în evidenţă cu ajutorul izotopilor (^{56}Mn) şi o cantitate foarte mică este eliminată prin urină. Funcţia manganului nu a fost încă elucidată. În *vitro*, manganul activează multe enzime: fosfatazele din sânge şi oase, fosfatazele din intestin şi ficat, arginaza, carboxilaza şi colinesteraza. Studii efectuate pe celule hepatice au confirmat ipoteza că mitocondria este locul intracelular principal unde este concentrat manganul. Deoarece mitocondriile sunt structurile asociate în sistemele intracelulare ale enzimelor din lanţul respirator, rolul manganului de coenzimă pentru aceste enzime este evident.

5.4.3. Proteinele plasmatice

Plasma sanguină conţine 60-80 g/l proteine, ceea ce corespunde unei cantităţi de 100-120 g proteine circulante. Cu excepţia imunoglobulinelor de origine plasmocitară, marea majoritate a acestor proteine se formează în hepatocite. Din cauza scăderii biosintezei, pierderii sau degradării excesive a proteinelor plasmatice se manifestă o hipoproteinemie; în schimb, creşterea cantităţii lor produce hiperproteinemie.

Masa moleculară a proteinelor plasmatice se modifică între 70 000 (*albuminele*) şi mai multe milioane de daltoni (*macroglobulinele*). În funcţie de compoziţia lor aminoacidică ele sunt substanţe amfotere, având punctul izoelectric la valori diferite de pH. Unele dintre ele prezintă variaţii individuale de grup (*alotipuri*). Cu excepţia albuminelor, care sunt alcătuite exclusiv din aminoacizi, restul globulinelor din plasmă conţin şi glucide sau/şi lipide fixate sub forma glico- şi lipoproteinelor. Scăderea sub 60 g/l a cantităţii lor se poate manifesta din cauza slăbirii biosintezei, a pierderii sau degradării lor excesive, iar creşterea cantităţii proteinelor plasmatice produce hiperproteinemie. Deoarece capacitatea maximă de transport al celulelor tubulare renale pentru proteinele filtrate glomerular (T_mP) este limitată, la valori de peste 100 g/l ale proteinemiei, cantitatea filtrată a proteinelor se reabsoarbe numai parţial şi restul se elimină prin urină (*proteinurie prerenală*).

Proteinele plasmatice se clasifică în trei grupe principale: fibrinogenul, albumina şi globulinele. La un total mediu de aprox. 100 g % proteine plasmatice, 4 g % îl reprezintă fibrinogenul, 57 g % albumina şi 38 g % globulinele.

Fibrinogenul este proteina care conferă prin prezenţa sa titlul de plasmă. Este insolubil în apă, dar solubil în diferite concentraţii saline. Fibrinogenul se transformă prin acţiunea trombinei în fibrină, insolubilă la 37°C, 20°C şi chiar la 0°C, fenomen ce constituie esenţa coagulării sângelui.

Albumina este constituentul major al proteinelor plasmatice sau serice, foarte solubilă în apă, cu masa moleculară cea mai mică. Ea are pH-ul izoelectric mult mai acid decât celelalte fracţiuni (4,7) şi destul de îndepărtat de pH-ul normal al plasmei (7,3) la care este încărcată negativ. Molecula sa are dimensiuni mici, forma aproape sferică, iar concentraţia plasmatică este mare.

Globulinele constituie fracţiunea cea mai heterogenă, cu caracteristici generale comune, dar cele speciale, deosebite. Electroforetic, ele se împart în α globuline (α_1 şi α_2), β globuline (β_1 şi β_2) şi γ globuline. Dintre ele, globulinele joacă un rol preponderent în fenomenele de imunitate a organismului. Celelalte fracţiuni participă de asemenea la o mare diversitate de fenomene.

Proteinele plasmatice împrumută proprietăţile substanţelor coloidale. Ele se găsesc legate între ele într-o structură submicroscopică, în care fibrinogenul cu structură fibrilară şi molecula cea mai mare formează o reţea fin dispersată în spaţiu, flexibilă, având în ochiuri globulinele de formă elipsoidală şi albumina sferoidală. Solul coloidal astfel format este îmbibat mai mult sau mai puţin cu apa plasmatică, creând o vâscozitate plasmatică. La modificările care ţin de cantitatea şi calitatea proteinelor, de gradul de imbibiţie apoasă, sau de pH-ul mediului de dispersie, aspectul stării de sol se schimbă, legăturile dintre particule se pot desface şi, în extremă, se poate ajunge prin precipitare la starea de gel. Aceste transformări se datorează însăşi caracteristicilor moleculelor proteice din plasmă.

Moleculele globulinice, mai mici decât ale fibrinogenului, sunt polare şi de aceea au solubilitate redusă, tendinţe crescute de asociere între ele sau cu alte substanţe. Astfel, globulinele se leagă de electroliţi, lipide, polizaharide, dând naştere la lipoproteine (fracţiunea β) şi glicoproteine (fracţiunea α). Vâscozitatea globulinelor este apreciabilă, deşi mai mică decât a fibrinogenului.

Albumina are molecula cea mai mică, este nepolară şi deci cu solubilitate crescută, fără însă să aibă capacitatea de a se combina cu compuşii mediului dispersat. Forma sa aproape sferică îi permite să fie înconjurată de un strat de apă pe care să-l absoarbă şi în felul acesta îşi menţine încărcătura electrică, stabilitatea şi i se micşorează vâscozitatea.

Se poate, deci, sintetiza structura proteică a plasmei ca fiind formată din fibrinogen cu rol de schelet, globulinele având uşurinţa combinării cu alte substanţe şi albumina cu rol în stabilitatea şi vâscozitatea plasmei, funcţie de imbibiţia ei apoasă.

Funcţiile pe care le îndeplinesc proteinele plasmatice în organism le determină a fi socotite ca cele mai importante substanţe existente în plasmă. Ele se pot enumera în felul următor:

a. Funcţia nutritivă, care arată că lipsa de proteine se poate substitui prin

introducerea de proteine plasmatice din care ţesuturile şi organele îşi iau necesarul fără ca metabolismul lor să sufere; pe de altă parte, ele în sine reprezintă o rezervă proteică semnificativă când aportul proteic scade. Albumina susţine nutriţia proteică a organismului.

b. Funcţia plastică, care constă în capacitatea proteinelor plasmatice de a fi utilizate la sinteza proteinelor celulare.

c. Menţinerea volumului sângelui prin albumine, ce asigură existenţa în circulaţie a unei cantităţi mari de apă, reglează raportul globule/plasmă şi aceasta afectează volumul sanguin.

d. Menţinerea tensiunii arteriale prin albumină care, reţinând apa, asigură o umplere corespunzătoare a patului vascular şi prin α_2 globulină ce conţine hipertensinogen (precursor al hipertensinei).

e. Mărirea mobilităţii hematiilor de către proteinele plasmatice, ce reduc frecarea de pereţii vaselor pe care, de altfel, le-ar distruge.

f. Stabilizarea suspensiei hematiilor în plasmă, prin menţinerea echilibrului dintre albumină, ce protejează stabilitatea suspensiei hematiilor pe de-o parte, şi globuline împreună cu fibrinogenul, care se manifestă în sens contrar pe de altă parte.

g. Transportul diverselor substanţe în sânge ca: hormoni, ioni, lipide, glucide, bilirubină, vitamine, pigmenţi, coloranţi, medicamente.

h. Homeostazia hemostazei în cadrul căreia proteinele plasmatice pun la dispoziţie factorii plasmatici ai coagulării şi fibrinolizei, pentru realizarea echilibrului fluido-coagulant sanguin.

i. Realizarea echilibrului hidroosmotic al sângelui, adică reglarea apei dintre sânge şi ţesuturi; datorită proprietăţilor lor coloidale, proteinele nu difuzează prin membrana capilară; prin presiunea lor oncotică ce alternează cu presiunea hidrostatică permit transportul de apă din sânge prin ţesut şi invers. În acest fel se hrănesc ţesuturile prin alimentaţie şi se elimină substanţele în urma catabolismului lor. Analog are loc şi reglarea raportului globulo-plasmatic ce ţine de hidratarea sângelui şi de imbibiţia apoasă a proteinelor plasmatice.

j. Constanţa echilibrului acido-bazic al sângelui şi în consecinţă stabilitatea pH-ului său, asigurate de caracterul amfoter al proteinelor ce acţionează ca un adevărat sistem tampon.

k. Funcţia de apărare specifică şi nespecifică a organismului prin fracţiunea globulinică ce conţine: imunoglobuline, sistemul complement, lizozim, transferină, properdină.

l. Menţinerea unei volemii constante.

Metode de separare

Pentru structura şi compoziţia proteinelor, metodele electroforetice ocupă un loc important în cadrul investigaţiilor ce se efectuează în această direcţie. Separarea electroforetică permite confirmarea unui diagnostic clinic sau detectarea unei condiţii patologice necunoscute. Particula de proteină încărcată electric migrează sub influenţa unui câmp electric cu o anumită mobilitate ce depinde şi de puterea ionică a tamponului.

Separarea clasică a proteinelor serice prin electroforeză prezintă 5 fracţiuni: albumină, α_1-globuline, α_2-globuline, β-globuline şi γ globuline (figura 76).

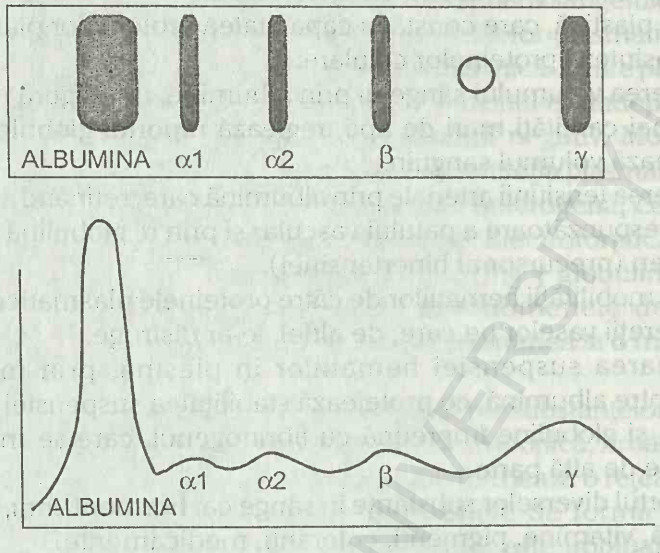


Fig. 76. Separarea electroforetică a proteinelor serice.

Electroforeza în gel de agar urmată de imunodifuzie separă 20-30 de componenţi. Acetatul de celuloză dă rezultate similare, dar zonele sunt mai nete datorită puterii superioare de rezoluţie. Dintre toate tipurile de electroforeză, însă, cea în gel de poliacrilamidă este optimă privind puterea de rezoluţie, aceasta nefolosindu-se în mod curent. Varianta cu tampoane multifazice separă 30 sau chiar mai multe fracţiuni, iar prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă cu gradient, sau cu focalizare izoelectrică se pot detecta aproape 60 de componenţi. Identificările pe zone separate prin ultimele două metode sunt extrem de utilizate în cercetare, datorită specificităţii procedeelor de detectare şi extrema lor sensibilitate. Progresele în domeniu au continuat. Printre acestea se numără focalizarea izoelectrică pe acetat de celuloză şi introducerea gelurilor subţiri de focalizare izoelectrică pe poliacrilamidă cu film Mylar ducând la performanţe superioare gelurilor simple, cu ele putându-se realiza diferite teste pe acelaşi gel. Transferul pe membrane imobilizate („*protein blotting*") este o altă alternativă foarte utilizată în acest scop.

Metodele electroforetice, nepermiţând determinarea proteinelor specifice, se pot cupla cu cele imunologice, precipitarea imună, fiind o modalitate frecvent uzitată în acest scop. Este vorba de electroimunodifuzie ce cuprinde imunoelectroforeza clasică unidimensională, „*rocket immunoelectrophoresis*" – Laurell, imunoelectroforeza încrucişată bidimensională cu variantele ei, contraimunoelectroforeza, imunofixarea etc. Totuşi, electroforeza proteinelor serice dă informaţii preliminare asupra gamopatiilor monoclonale, prezintă profilul specific al unui organ (hepatic, renal etc.), furnizează date chiar când

rezoluţia este săracă deoarece proteinele migrează ca benzi omogene.

Metodele cromatografice permit de asemenea separarea proteinelor, DEAE celuloza şi Sephadexul pentru filtrarea în gel fiind cele mai frecvente substanţe utilizate în acest scop. Pentru studierea mai aprofundată a caracteristicilor proteinelor plasmatice se apelează chiar la cromatografia de afinitate, atunci când acestea prezintă o activitate biologică specifică. Se mai pot combina metodele electroforetice cu cele cromatografice – electrocromatografia – când se obţine separarea proteinelor plasmatice sub formă de „amprente peptidice" ca urmare a hidrolizei lor.

Ultracentrifugarea separă proteinele plasmatice după constantele lor de sedimentare. Utilizarea precipitării cu soluţii saline (în special cu sulfat de amoniu) separă şi purifică albuminele, globulinele, variind concentraţia sării. Se poate, de asemenea, realiza o separare cu solvenţi organici (în special etanol), la rece, după metoda Cohn, când, modificând concentraţia, tăria ionică şi pH-ul mediului se produc şi modificări de solubilitate, care conduc la separarea fracţiunilor proteice din plasmă.

Disproteinemia se defineşte ca orice variaţie calitativă şi/sau cantitativă a compoziţiei proteice a plasmei faţă de normal. Determinarea proteinemiei totale şi în special separarea electroforetică (proteinograma) constituie etapele de triaj (atât cantitatea totală şi parţială a diverselor fracţiuni proteice, cât şi aspectul lor calitativ), date preţioase ce pot contribui la elucidarea unui diagnostic. Chiar un tablou normal al acestor analize grosiere poate ascunde uneori aspecte patologice. De aceea ele trebuiesc completate şi puse în legătură cu întregul context clinic.

În cursul evoluţiei diferitelor procese patologice, cantitatea proteinelor se modifică *în mod nespecific*, prin manifestarea hipoproteinemiilor sau hiperproteinemiilor, cu scăderea cantităţii albuminelor şi creşterea globulinelor. Totuşi, pe baza unor aspecte caracteristice ale proteinogramelor pot fi deosebite următoarele 5 tipuri de disproteinemii:

1. **Tipul inflamaţiei acute** este caracterizat printr-o creştere moderată a proteinemiei, o scădere mai puţin accentuată a cantităţii albuminelor, o creştere moderată a α_1- şi una marcantă a α_2-globulinelor, purtătoarele *reactanţilor de fază acută*, însoţită de o moderată creştere a γ-globulinelor.

2. **Tipul inflamaţiei cronice** este caracterizat printr-o hiperproteinemie şi o hipoalbuminemie, o creştere mai moderată a α_1- şi α_2-globulinelor, dar printr-una semnificativă a γ-globulinelor neomogene (cu *bază largă* în proteinogramă). Creşterea concomitentă a α_2-globulinelor pledează pentru o inflamaţie subacută sau cronică activă. În cadrul acestui tip se descriu 2 subtipuri:

2a) tipul endocarditei subacute (lente) în care creşterea cantităţii anticorpilor omogeni împotriva factorului cauzal (*Streptococcus viridans*) se prezintă în proteinogramă sub forma unei fracţiuni γ-globulinice omogene, cu bază îngustă, sub forma unei imagini *a urechii de măgar*. Din cauza antibioterapiilor eficace, în zilele noastre, manifestarea acestei forme a endocarditelor microbiene devine din ce în ce mai rară;

2b) tipul sindromului nefrotic în care prin scăderea marcantă din cauza eliminării renale a cantităţii albuminelor şi a γ-globulinelor serice, proteinograma prezintă aspectul opus al tipului anterior. Intensificarea exagerată a α_2 şi β-globulinelor se datorează creşterii reactanţilor de fază acută, respectiv a cantităţii lipidelor din plasmă.

3. **Tipul gradientului monoclonal** M. În cazul transformării maligne a unei populaţii omogene (clone) β-limfocitare, populaţia plasmocitară derivată din aceasta produce un singur tip de imunoglobulină sau fragment al acesteia, numită monoclonală (M). Aceste proteine se găsesc pe proteinogramă în domeniul γ-globulinelor, sub forma unor fracţiuni omogene, înalte şi cu baza îngustă, numite gradienţi monoclonali (M). În cazul moleculelor complete tetrametrice, clasa imunoglobulinelor monoclonale, poate fi stabilită cu o aproximaţie destul de bună prin localizarea ei: IgM în β_1 (macroglobulinemia *Waldenström*), IgA în β_2 şi IgG în γ. Clasele lanţurilor libere uşoare (boala *Kahler*) sau grele (boala *Franklin*) pot fi identificate cu ajutorul unor seruri imune monospecifice precipitante. Mai demult, proteinele din gradienţii M au fost denumite *paraproteine*, pe baza considerentului că ele au o compoziţie aminoacidică şi o structură modificată, deosebite de cele normale. Din studiul amănunţit al acestor proteine monoclonale a reieşit în mod convingător că structura şi compoziţia lor aminoacidică corespund întru totul proprietăţilor fizico-chimice ale imunoglobulinelor normale. Astfel ele nu pot fi considerate patologice, ci normale, produse în exces din cauza dereglării biosintezei lor.

Cele 11 anomalii ale modelelor electroforetice sintetizate după Ritzman şi Daniels sunt arătate în figura 77.

a. panhipoproteinemie prin scăderea marcantă a celor mai multe sau a tuturor fracţiunilor electroforetice prin pierderea „globală" de proteine cuplată cu hipoproteinemie totală;

b. hipoalbuminemie prin sinteza scăzută a albuminei, pierderi necompensate, catabolism crescut de albumină;

c. hipo α_1-globulinemie datorată deficienţei de α_1 antitripsină, hipolipidemie;

d. hiper α_1-globulinemie prin creşterea α_1 antitripsinei;

e. hiper α_2-globulinemie care are mai multe cauze: o eventuală proteină M, hiperlipidemie, α_2-macroglobulinemie, haptoglobinemie;

f. hiper α_2-globulinemie asimetrică datorată complexelor haptoglobină-hemoglobină ce apar prin hemoliză, în *vitro*;

f. hipo-globulinemie până la a γ-globulinemie;

h. hiper-globulinemie policlonală ce se reflectă printr-un aspect difuz, larg, heterogen de hiper γ-globulinemie, când cresc toate imunoglobulinele serice majore;

i. gamopatie oligoclonală cu heterogenicitate mai restrânsă, ce apare ca o bandă de γ-globuline compactă şi se datorează unei creşteri semnificative, doar a unei mici porţiuni de fracţiune γ-globulinică; cu toate acestea gamopatia este policlonală, deoarece ambele lanţuri uşoare k şi λ sunt crescute, model

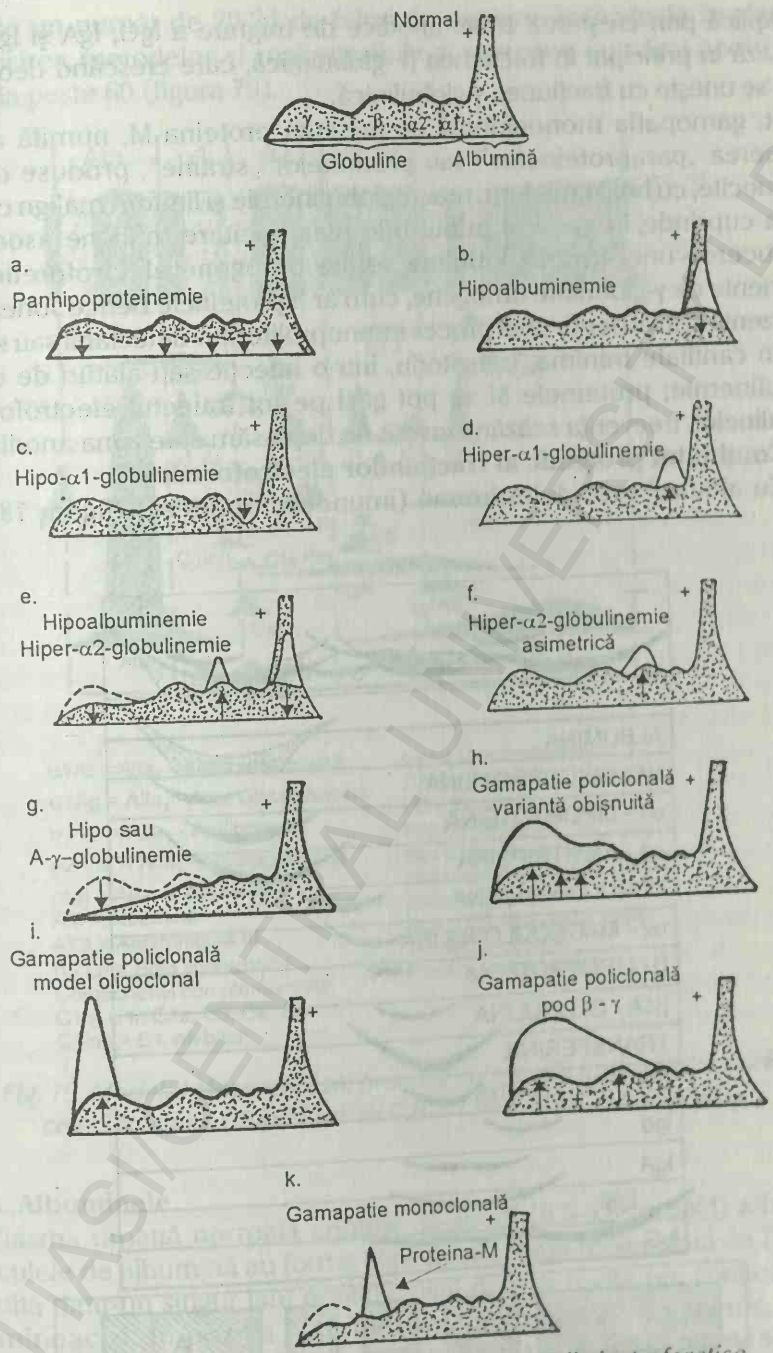


Fig. 77. Aspectele anormale ale separării electroforetice.

ce poate fi uşor confundat cu cel în care apare proteina M;

j. podul βγ–globulinelor (β*γ-bridging*) care se caracterizează prin creşterea fracţiunii γ-globulinemice ce fuzionează cu fracţiunea β γ-globulinelor; faptul

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

se explică prin creşterea zonei anodice de migrare a IgG, IgA şi IgM ce se situează în principal în fracţiunea β -globulinică, care crescând deosebit de mult se uneşte cu fracţiunea γ-globulinică;

k. gamopatia monoclonală ce prezintă proteina M, numită aşa prin asocierea „paraproteinelor" sau proteinelor „străine", produse de către plasmocite, cu bolile mielom, macroglobulinemie şi limfom malign cu celulă B; ea cuprinde în general tulburările plasmocitare maligne asociate cu producerea unei imunoglobuline serice omogene electroforetic şi/sau fragmente de γ-globuline omogene, cum ar fi proteinele Bence Jones; poate fi prezentă şi în absenţa unui proces imunoproliferativ detectabil sau se poate afla în cantitate minimă, tranzitoriu, într-o infecţie sau alături de o hiperglobulinemie; proteinele M se pot găsi pe tot traiectul electroforetic al globulinelor, frecvenţa scăzând cu cât ne deplasăm spre zona anodică.

Conţinutul proteinic al fracţiunilor electroforetice

Cu ajutorul metodelor imune (imunoelectroforeza) (figura 78) pot fi

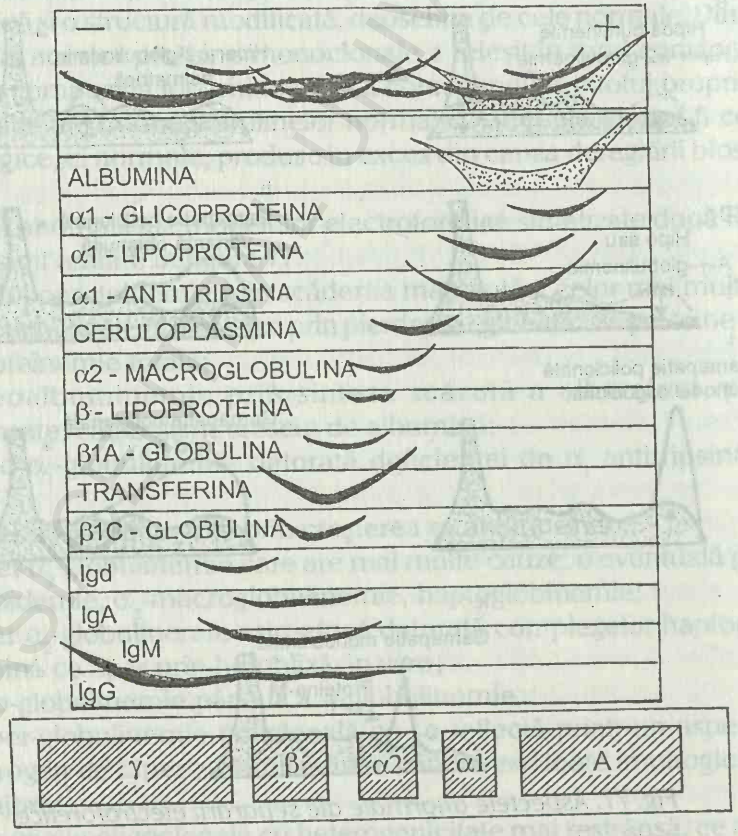
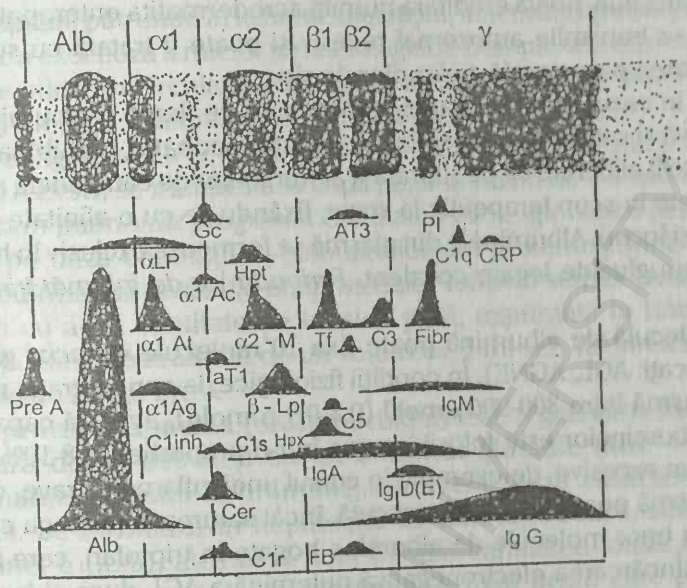


Fig. 78. Distribuţia fracţiunilor proteice serice obţinute prin imunoelectroforeză.

deosebite un număr de 20-24 de feluri de proteine individuale în plasmă. Prin folosirea metodelor şi mai sensibile şi selective numărul acestora a crescut la peste 60 (figura 79).



α1Ac =Alfa$_1$ - Antichimotripsină
α1Ag = Alfa$_1$ - Acid Glycoproteină
α1 At = Alfa$_1$ - Antitripsină
α2 - M = Alfa$_2$ - Macroglobulină
αLp = Alfa - Lipoproteină
Alb = Albumină
AT3 = Antitrombină III
β - Lp = Beta lipoproteină
Componenţii complementului
C1q, C1r, C1s, C3, C4, C5
C1inh = C1 inhibitor
Cer = Ceruloplasmină
CRP = Proteina C - Reactivă
FB = Factor B
Fibr = Fibrinogen
Hpt = Haptoglobină
Hpx = Hemopexină
Immunoglobuline
Ig A, Ig D, Ig E, Ig G, Ig M
Pl = Plasminogen
Pre A = Prealbumină

Fig. 79. Modelul electroforezei proteice cu speciile individuale cuprinse în cele 5 fracţiuni (după Laurell C.B., "Clin Chem", 19, 99, 1973).

A. Albuminele

Plasma umană normală conţine 35-40 g/l (0,5-0,8 mmol/l) albumine. Moleculele de albumină au forma elipsoidală, masa moleculară de 70 000 d, alcătuită dintr-un singur lanţ peptidic pliat de mai multe ori, conţinând 580 de aminoacizi. În poziţia N-terminală se găseşte *acid aspartic*, în cea C-terminală există *leucină*. De-a lungul structurii peptidice se repetă secvenţe hidrofile şi hidrofobe, la nivelul cărora moleculele albuminelor pot fixa diferite substanţe micromoleculare ca apa, ioni, acizi graşi, coloranţi, bilirubină, medicamente etc. Prin aceasta, albuminele au o importanţă funcţie de transport nespecifică şi specifică. În contrast cu celelalte metale vehiculate în

plasmă de proteine transportoare specifice, zincul plasmatic este fixat lax de albumine şi de unii aminoacizi (histidina, cisteina), şi mult mai puternic de moleculele α_2-macroglobulinei, ale enzimelor lacto-dehidrogenaza şi fosfataza alcalină. Boala ereditară numită acrodermatita enteropatică (*boala Danbolt*) se transmite autozomal recesiv şi poate fi tratată cu succes prin administrarea parenterală a sărurilor de zinc.

Ca şi în cazul cromatografiei, capacitatea de fixare a albuminelor este competitivă şi saturabilă. Astfel, în caz de icter neonatal, bilirubina fixată anterior poate fi eliberată de pe suprafaţa albuminelor de către unele antibiotice administrate în scop terapeutic la sugar, fixându-se cu o afinitate mai mare pe aceleaşi locuri. Albuminele din plasmă se formează exclusiv în hepatocite şi nu conţin glucide legate covalent. *Perioada* lor *de înjumătăţire* este de 2 zile.

O moleculă de albumină poate fixa 10 molecule de *acizi graşi liberi* (neesterificaţi: AGL, AGNE). În condiţii fiziologice, la concentraţia normală a AGL în plasmă între 300-900 μmol/l (0,3-0,9 mmol/l), această capacitate de fixare a albuminelor este folosită numa într-o proporţie de 8-10%. În urma unei lipolize excesive, de exemplu în cursul unei inflamaţii grave, cantitatea AGL în plasmă poate fi atât de crescută, încât saturează întreaga capacitate de fixare a unor molecule de albumine bogate în triptofan, care fixează şi tironinele. Încărcarea electronegativă puternică a AGL duce şi la creşterea electronegativităţii moleculelor fixatoare, la creşterea mobilităţii lor electroforetice şi la apariţia *fracţiunii prealbuminice* în proteinogramă. Cazuri de creştere patologică a cantităţii albuminelor din plasmă, sub forma unei *hiperalbuminemii*, nu se cunosc. *Hipoalbuminemii* mai mult sau mai puţin accentuate apar aproape fără excepţie în toate stările patologice cunoscute, din cauza consumului sporit (secreţie, excreţie) sau a formării insuficiente (hepatopatii).

Analbuminemia este o anomalie ereditară rară, transmisă autozomal recesiv, care se manifestă prin lipsa totală a albuminelor din plasmă, respectiv din proteinogramă. Bolnavii nesupuşi unor încărcări a capacităţii de transport nespecific al globulinelor din plasmă, aparent nu prezintă nici un semn patologic deosebit. Totuşi, scăderea presiunii coloido-osmotice din cauza lipsei albuminelor este compensată printr-o creştere corespunzătoare a cantităţii globulinelor (hiperproteinemie).

B. **Globulinele**

Fracţiunile globulinice din proteinogramă cuprind o serie de proteine individuale (glico- şi lipoproteine) cu aceeaşi viteză de migrare electroforetică, dar cu structură şi funcţii deosebite.

1. α_1-globulinele

α_1-antitripsina (inhibitor de proteaze, P_i), este o glicoproteină, formată în hepatocite, cu masa moleculară de 55 000 d. Concentraţia sa normală în plasmă este de 2 g/l (200 mg %). În condiţii fiziologice alcătuieşte circa 90% din fracţiunea α_1-globulinică din plasmă. Are mai multe alotipuri (A = activă, M = medie, Z = inactivă), care se pot combina şi sub diferite forme heterozigote (AM, AZ, MZ). Forma homozigotică ZZ este inactivă. Efectul

antiproteazic al α_1-antitripsinei se manifestă prin blocarea reversibilă a centrului activ al serinproteazelor, formând complexe echimoleculare cu ele. Din cauza molecularităţii reduse, α_1-antitripsina traversează uşor dechizăturile pereţilor capilari, pătrunde în lichidul interstiţial, inactivând şi serinproteazele eliberate prin exocitoza a micro- şi macrofagelor. Complexele echimoleculare realizate se întorc în circulaţie, unde proteazele se transmit moleculelor de α_2-macroglobulină. α_1-antitripsina eliberată îşi reia activitatea.

Lipsa congenitală a α_1-antitripsinei (*boala Laurell-Ericson*), transmisă autozomal recesiv, se manifestă la copii până la vârsta de 2-3 ani, sub forma unui *emfizem pulmonar progresiv*. Cantitatea de α_1-globuline poate fi bine apreciată pe baza cantităţii α_1-globulinelor din proteinogramă, dar şi cu ajutorul determinării *activităţii antiproteazice totale a serului* (AAPTS), care este egală cu acea cantitate de tripsină pură, exprimată în U/ml, a cărei activitate poate fi neutralizată de un volum de 1 ml ser. Valoarea normală a AAPTS este de 2±0,5 U/ml.

Glicoproteina α_1-acidă (orosomucoidul) este o glicoproteină cu masa moleculară de 44 000 d şi cu un conţinut glucidic între 40-45%, cu predominanţa acidului neuraminic, care realizează caracterul acid al substanţei. Se formează în hepatocite în cantităţi reduse, sub acţiunea interleukinei 6 (IL-6), alcătuind doar 5% din cantitatea totală a fracţiunii α_1-globulinice, fiind unul dintre *reactanţii de fază acută* care participă la apărarea organismului împotriva reacţiilor de apărare proprie în exces, cantitatea ei creşte mult în cursul inflamaţiilor acute, subacute şi cronice, dar şi la bolnavii cu tumori maligne. Hepatocitele lezate (ca în cursul hepatitelor sau altor hepatopatii) îşi pierd treptat capacitatea de a sintetiza reactanţi de fază acută. Concentraţia normală în plasmă a glicoproteinei α_1-acide este de 0,6-0,8 g/l, respectiv 60-80 mg %.

Lipoproteine cu densitate mare (α_1-lipoproteinele, HDL) sunt prezentate în capitolul „Lipoproteinele plasmatice" (5.4.5).

α_1-fetoproteina este o glicoproteină cu masa moleculară de 65 000 d. Se formează tot în hepatocite, dar numai în cantităţi foarte mici (sub 100 ng/l = 10 ng %). În cursul vieţii embrionare, însă, are o concentraţie mare în sângele fetal, având funcţia de a fixa şi a neutraliza efectele dăunătoare ale estrogenilor pătrunşi transplacentar în făt din organismul mamei. Cantitatea α_1-fetoproteinei scade rapid în sângele nou-născutului. În cazurile de hepatom malign, însă, gena suprimată se reactivează în hepatocite şi se declanşează biosinteza citoplasmatică a acestui *marker tumoral* (care nu este un antigen tumoral, ci un *antigen asociat cancerului*) într-o măsură în care el poate fi pus în evidenţă calitativ sau determinat cantitativ (valori de peste 1 000 ng/l = 100 ng %). Totuşi, specificitatea apariţiei în plasmă a acestui marker nu este exclusivă, deoarece reapariţia în plasmă α_1-fetoproteinei poate să existe şi în ciroza hepatică, respectiv în inflamaţii severe.

2. α_2-globulinele

α_2-macroglobulinele sunt glicoproteine cu masa moleculară între 725 000 - 850 000 d, heterogenitatea masei moleculare fiind cauzată de

conţinutul variabil în glucide al moleculelor. Cantitatea normală în plasmă este de 1,5-4,0 g/l (150-400 mg %). Deşi nu este un reactant de fază acută, cantitatea ei creşte la bolnavii cu *sindrom nefrotic* şi scade în hepatopatii. Ele acţionează ca antiproteaze împotriva serinproteazelor, dar numai în interiorul patului vascular; inactivează antiproteazele atât în mod direct, cât şi sub formele transmise de către α_1-antitripsină sau de alte antiproteaze ale sistemului de coagulare sanguină. Se formează în hepatocite; nefiind un reactant de fază acută, cantitatea lor plasmatică nu creşte în cursul inflamaţiilor. În schimb, în cazuri de insuficienţă hepatică ele scad progresiv în plasmă.

Haptoglobina este o glicoproteină cu masa moleculară de circa 100 000 d, alcătuită dintr-o pereche de lanţuri peptidice(9 000 d) şi β (42 000 d), legate între ele prin punţi disulfidice. Haptoglobina are 2 alotipuri: 1 şi 2. Acestea se pot combina sub 3 forme, din care 2 homozigotice (1,1 şi 2,2) şi una heterozigotică (1,2). Rolul fiziologic al haptoglobinei constă în fixarea echimoleculară a hemoglobinei libere, pătrunsă în plasmă în cantităţi reduse în urma descompunerii hematiilor îmbătrânite. Din cauza dimensiunilor lor reduse (69 000 d), moleculele de hemoglobină ar trece uşor peste filtrul glomerular în urină. Sub forma legată de macromoleculele haptoglobinei, ele se reţin în circulaţie şi conţinutul lor în fier poate fi reutilizat.

Haptoglobina este un reactant de fază acută care se formează în hepatocite sub acţiunea IL-6, în cantităţi mari în cursul inflamaţiilor microvasculare, dar şi peritumorale.

Ceruloplasmina. Organismul adult sănătos conţine în total 75-150 mg (14-24 mmol) cupru, în primul rând sub forma depozitată în hepatocite şi în neuroni. Conţinutul normal în cupru al plasmei este între 15 şi 24 μmil/l (90-110 μg %), din care 90% se găseşte sub formă fixată de o glicoproteină, numită *ceruloplasmină*. Restul de 10% este slab fixat de albumine, reprezentând cantitatea *cuprului liber*. Numele de ceruloplasmină provine din faptul că, din cauza prezenţei cuprului în molecula ei, glicoproteina purificată formează cristale de culoare albastră.

Din cauza conţinutului ei glucidic variabil, masa moleculară a ceruloplasminei se modifică între 130 000 şi 160 000 d, fiind octamerul format din câte o pereche de 4-4 peptide α şi β, capabile să fixeze câte un ion de cupru bivalent (cupric). Masa moleculară este de 17 000 d. Până în prezent s-au identificat 7 alotipuri diferite ale ceruloplasminei.

Conţinutul în ceruloplasmină al plasmei sanguine la nou-născut este foarte redus. Ca urmare, transportul cuprului în organismul lui se face aproape exclusiv sub forma legată de albumine. În cursul săptămânilor următoare, cantitatea ceruloplasminei creşte treptat în plasmă, realizând la vârsta de un an, valoarea normală (2,0 μmol/l, respectiv 35 mg %). Fiind un reactant de fază acută, cantitatea ceruloplasmei este crescută şi în plasma gravidelor, dar şi în cazuri patologice (inflamaţii microvasculare, ciroză hepatică, infarctul miocardic, tumori maligne etc.). Ceruloplasmina dispune şi de o acţiune enzimatică oxidazică, manifestată în cursul lanţului respirator. Cantitatea existentă în plasmă poate fi determinată fie pe baza oxidării parafenilen-

diaminei într-un produs de culoare roşie, fie cu ajutorul imunodifuziei radiale.

Printr-o alimentaţie obişnuită, organismul primeşte zilnic o cantitate de 50-80 μmoli (3-5 mg) cupru. Cantitatea reabsorbită ajunge în ficat şi se fixează de proteinele fixatoare de metale, numite *metalotioneine*, printre care şi de *hepatocupreină*. O parte (8-15 μmoli) a cuprului depozitat în hepatocite, prin intermediul aparatului Golgi, se excretă în bilă. Prin urină se elimină zilnic circa 0,3 μmoli/d (20 μg/d). La bolnavi cu *boala Wilson*, această cantitate poate fi şi de 3 ori mai mare (0,8 μmoli/d respectiv 55 μg/d).

Stări carenţiale de cupru pot apare în malabsorbţie, rareori din cauza conţinutului redus în cupru al alimentaţiei, mai rar din cauza unor boli ereditare, ca *boala Menkes* sau tricopolidistrofia şi *boala Wilson*.

Boala Menkes (tricopolidistrofia) se moşteneşte în mod similar cu hemofiliile, sub formă legată de cromozomul X, dar manifestându-se la băieţi prin scăderea substanţială a reabsorbţiei cuprului din duoden. Din această cauză şi cupremia este foarte scăzută, ca şi cantitatea cuprului urinar. În urma scăderii cantităţii cuprului, părul devine dur şi ondulat. În urma accidentelor vasculare cerebrale repetate, bolnavii rareori depăşesc vârsta de 3 ani.

Boala Wilson (degenerarea hepato-lenticulară) se moşteneşte autozomal recesiv şi este caracterizată prin scăderea marcantă sau chiar lipsa excreţiei în bilă a cuprului din lizozomii hepatocitelor. În marea majoritate a cazurilor această defecţiune este asociată şi de scăderea cantităţii ceruloplasminei. Cuprul acumulat în hepatocite provoacă distrugerea acestora. În locul parenchimului hepatic se formează ţesut conjunctiv, ducând la manifestarea progresivă a unei ciroze hepatice grave. Cantitatea mare de cupru eliberată în sânge se fixează lax de albumine. În ciuda creşterii exagerate a cuprului eliminat prin urină se depun totuşi cantităţi din ce în ce mai mari în ţesuturi, cu precădere în creier, în rinichi şi în cornee. Din această cauză apar tulburări funcţionale nervoase (psihice, motorii), renale şi apar *inelele Kaiser-Fleischer* pe cornee. Depunerea excesivă a cuprului în ţesuturi poate fi redusă, precum şi eliminarea lui sporită prin urină poate fi realizată cu ajutorul administrării unor substanţe chelatoare, ca *D-penicilamina*.

3. β-globulinele

Transferina (siderofilina). Din cantitatea totală de 3-5 g a fierului din organism, plasma conţine 15-25 μmoli/l (100-130 μg %) la bărbaţi şi 14-24 μmoli/l (90-120 μg %) la femei, sub formă legată de o proteină numită transferină sau siderofilină, formată în hepatocite, dar în cantităţi reduse şi în splină, în ganglionii limfatici şi în celulele epiteliale ale mucoasei intestinale. Conţinutul normal în transferină al plasmei este de 60 μmoli/l (0,2-0,3 g/l), respectiv de 200-300 mg %).

Transferina este o glicoproteină cu mobilitatea electroforetică a β_1-globulinelor, formată dintr-un singur lanţ peptidic cu masa moleculară de 80 000 d, cu mai multe forme alotipice B, D şi variaţiile acestora, dintre care cele din forma B sunt foarte frecvente. Fiecare moleculă de transferină are două porţiuni fixatoare de fier trivalent (feric). Proteina lipsită de fier se găseşte

sub *formă apoferică*, cea conţinând un atom de fier are *forma monoferică*, iar cea cu 2 atomi de fier are *forma biferică* sau *saturată*. În condiţii fiziologice, circa 30% din transferină se găseşte sub formă saturată.

Capacitatea de fixare a fierului de către transferină (*Iron Binding Capacity*, IBC) înseamnă cantitatea de fier necesară pentru realizarea saturaţiei acestei capacităţi. Capacitatea totală de fixare a fierului (*Total Iron Binding Capacity* = TIBC) se calculează din suma valorii sideremiei şi a capacităţii de fixare a fierului (IBC). Coeficientul de saturaţie se calculează din raportul sideremiei şi a capacităţii totale de fixare a fierului. Tabelul 21 prezintă valorile normale ale capacităţii de fixare a fierului şi ale coeficientului de saturaţie a celor două sexe.

Tabelul 21

Valorile normale ale capacităţii de fixare a fierului şi ale coeficientului de saturaţie la bărbaţi (B) şi femei (F)

	μmol/l		μg %	
	B	F	B	F
Capacitatea de fixare	32-50	27-45	180-280	150-250
Capacitatea totală de fixare	54-72	45-63	300-400	250-350
Coeficientul de saturaţie	40%	35%		

Celulele consumatoare (eritroblaşti, hepatocite, macrofage) preiau fierul Fe^{3+} transportat de transferină în urma fixării acestuia pe *structurile lor receptoare* specifice. În cursul inflamaţiilor, macrofagele activate înglobează cantităţi însemnate de fier plasmatic, împreună cu transferina. Această formă a hiposideremiei poate fi totuşi uşor deosebită de hiposideremia cauzată de o carenţă adevărată de fier. În cursul inflamaţiilor, cantitatea fierului seric scade paralel cu cantitatea transferinei, pe când în anemiile feriprive, concomitent cu scăderea sideremiei se semnalează creşterea marcantă a transferinei.

Factorul C_3 de complement este o glicoproteină cu masa moleculară de 180 000 d, formată din două lanţuri peptidice şi β, legate între ele prin 3 punţi disulfidice. În cursul fazei a doua, de amplificare a activării sistemelor de properdină şi de complement, factorul C_3 se scindează enzimatic în mai multe fragmente numite *anafilotoxine*. Conţinutul normal al plasmei în C_3 se situează între 0,5-1,5 g/l (50-150 mg %). Scăderea cantităţii factorului C_3 înseamnă un consum sporit (activitate citolitică marcantă), iar ridicarea valorilor C_3 în plasmă pledează pentru scăderea consumului, adică pentru încetinirea mecanismelor citolitice. Lipsa congenitală a C_3 este o anomalie ereditară

rară, transmisă autozomal recesiv, caracterizată prin reducerea capacităţii de apărare umorală nespecifică.

β_1-microglobulina este formată dintr-un singur lanţ peptidic cu masa moleculară de 11 000 d, care reprezintă lanţul peptidic uşor al haplotipurilor antigenice de histocompatibilitate de clasa I (HLA-A, B şi C). Plasma normală conţine cantităţi reduse (1-2 mg/l) din β1-microglobulină, deoarece se filtrează la nivelul glomerulilor renali şi se elimină repede prin urină. Cantitatea eliminată renal creşte în cursul distrugerilor tisulare (inflamaţii, tumori maligne, respingerea grefelor); ca urmare, cantitatea ei serică creşte în stări de anurie.

Antigenul carcino-embrionar (ACE, în engleză: CEA) este o glicoproteină cu masa moleculară de 55 000 d. El se formează în celulele limfatice din plăcile Payer ale tubului digestiv în cursul vieţii embrionare. După naştere, gena lui structurală devine reprimată şi în condiţiile fiziologice plasma copilului şi cea a adultului conţine numai urme de CEA. În celulele transformate malign ale tubului digestiv (de la eofag până la rect) gena reprimată se activează din nou (depresiune) şi comandă biosinteza CEA, ca un *antigen asociat cancerului* tubului digestiv. În urma eliminării chirurgicale a tumorii primare, cantitatea în plasmă a CEA scade într-o măsură considerabilă, iar în urma unei recidive creşte paralel cu creşterea masei tumorale.

4. γ-globulinele

Fracţiunea largă gamaglobulinică situată spre catod pe proteinogramă conţine un spectru larg de *imunoglobuline*, produse de un număr foarte mare de populaţii individuale de *imunocite* (plasmocite derivate de B-limfocite). Similar cu celelalte globuline, în mediu alcalin, gamaglobulinele sunt încărcate electronegativ şi ar trebui să migreze spre anod. Totuşi, din cauza torentului puternic de lichid, numit electroosmoză, care traversează în sens opus mediul gelificat, situat între cele două rezervoare de tampon, ele sunt deplasate spre catod. În cursul acestei deplasări se manifestă din partea porilor gelului un *efect de filtrare* sau o *difuziune limitată* (*electrofocuzare*) faţă de moleculele de diferite dimensiuni. Astfel, de obicei, în imediata apropiere a liniei de pornire ($\beta_{2,1}$) se vor aduna macroglobulinele (IgM), în zona de mijloc (β_2) imunoglobulinele din clasa IgA, iar în zona terminală (γ) IgG. Această localizare se manifestă şi în cazul gradienţilor M formaţi din molecule de Ig incomplete. Lanţurile uşoare sau grele separate se localizează între zonele IgM şi IgA ale gamaglobulinelor. Compuşii agregaţi pot migra împreună cu orice fracţiune a proteinogramei, în funcţie de încărcarea lor electrică şi de gradul lor de agregare. Este de remarcat că, din cauza maselor lor moleculare relativ mici (22 000 respectiv 44 000 d), la nivelul glomerulilor renali se filtrează în primul rând lanţurile uşoare sub forma proteinelor *Bence-Jones*, (boala *Kahler*) şi apoi cele grele (boala *Franklin*) separate. Un reactant de fază acută, lipsit încă de glucide, numit *proteina C-reactivă* (PCR) şi care poate fi pus în evidenţă în plasmă, numai în cursul unor stări postagresive, se localizează în proteinogramă tot în zona intermediară a gamaglobulinelor.

5.4.4. Glicoproteinele plasmatice

Glicoproteinele sunt componente proteice secretate în special de celule şi localizate pe suprafaţa lor exterioară, ce posedă o varietate largă de lanţuri covalente ataşate de polizaharide. Glicoproteinele secretate includ proteine ce funcţionează ca hormoni (de ex. cel de stimulare a tiroidei, de stimulare a foliculului), proteine cu matriţă extracelulară, proteine implicate în coagulare, o parte majoră a mucusului secretată de celulele epiteliale, multe din proteinele complementului, anticorpi, multe din proteinele membranelor plasmatice ce sunt antigeni care determină sistemul antigenic sanguin, determinanţii de histicompatibilitate şi de transplant, diverse enzime digestive secretate în intestin, proteine importante structural (colagen, hemină, fibronectină), proteina antivirală-interferon. Pe suprafaţa celulei, glicoproteinele funcţionează ca receptori pentru a transmite semnale hormonilor sau factorilor de creştere din mediul exterior înspre celulă. În acest fel, modificările membranelor glicoproteinelor se pot corela cu geneza hormonilor şi transformările maligne.

Conţinutul de glucide din glicoproteine este variabil: în anticorpul IgG sunt foarte puţine (4% din greutate), în glicoforin-glicoproteina eritrocitelor umane de membrană peste jumătate din compoziţie (60% în greutate), iar în cea gastrică umană în cantitate mare (peste 80% în greutate).

Cu excepţia albuminelor (şi a reactantului de fază acută PCR), toate proteinele din plasmă sunt glicoproteine, având un conţinut glucidic între 3-40%.

Enzimele glicoziltransferaze, localizate de-a lungul tubilor reticulului endoplasmatic şi al cisternelor aparatului lui Golgi, se activează datorită unor *secvenţe aminoacidice signal* ale proteinelor. În unele cazuri, se transferă catene glucidice preformate, legate de un polimer izoprenic, numit *dolicol*. Pe baza celor prezentate este evident că, spre deosebire de stabilitatea riguroasă a felului şi secvenţei aminoacizilor din proteine, stabilite de codul genetic, compoziţia şi lungimea catenelor laterale glucidice ale proteinelor prezintă variaţii considerabile, pe de o parte în funcţie de felul şi localizarea glicoziltransferazelor de-a lungul tubilor ergastoplasmei, iar pe de altă parte, de oferta cantitativă şi calitativă a monozaharidelor respective. De ex. la bolnavii cu diabet zaharat, din cauza glicemiei crescute (ofertei mari de glucoză!) creşte *glicozilarea proteinelor*, inclusiv a *hemoglobinei eritrocitare*. Dat fiind că, durata medie de viaţă a hematiilor este de 120 de zile, dozarea hemoglobinei glicozilate semnalizează fidel evoluţia în timp a bolii.

Catenele glucidice laterale şi glicoproteinelor au un rol protector mecanic (stabilizator) şi biologic (rezistenţă la proteoliză); contribuie uneori la determinarea antigenicităţii unor proteine (grupele sanguine ABO); în mod similar cu *lectinele* vegetale, ca *structuri receptoare* pot fixa în mod specific unii mediatori sau alte glicoproteine, având în poziţie terminală unele glucide deosebite.

Adiţionarea unităţilor glucidice, care se poate face de-a lungul întregului lanţ polipeptidic sau concentrat în zone bine definite, apare în urma unor reacţii individuale catalizate enzimatic în timpul trecerii lanţului polipeptidic prin reticulul endoplasmatic şi complexul Golgi. Uneori adiţionarea glucidelor poate să fie parţială şi glicoproteinele să se secrete într-o stare incompletă de „maturizare". Aceasta explică microheterogenitatea lor în ceea ce priveşte compoziţia glucidică chiar în acelaşi organism (formele A şi B ale ribonucleazei pancreatice ce diferă doar prin compoziţia lor glucidică).

Majoritatea glicoproteinelor conţin reziduuri de glucide în forma dextro, cu excepţia levo-fucozei, levo-arabinozei şi levo-acid iduronic.

Din punct de vedere structural şi funcţional pot fi deosebite două grupe mari de glicoproteine:

a) **Glicoproteine de tip mucinic (glicozaminoglicani)** ce sunt formate din peptide înconjurate în întregime dintr-un înveliş format din derivaţi glucidici polimerizaţi. Aceste glicoproteine au pe de o parte rol structural (ca acidul hialuronic în substanţa fundamentală), pe de altă parte rol lubrifiant (ca mucinele în secreţii).

b) **Glicoproteinele de tip seric** ce reprezintă glicoproteinele propriu-zise, ale căror lanţuri peptidice sunt cuplate la nivelul unor aminoacizi deosebiţi (ac. aspartic, ac. glutamic) prin legături cu catene glucidice, având o compoziţie glucidică şi o lungime variabilă. În cursul *transformărilor posttranslaţionale* ale proteinelor, primul component glucidic cuplat cu proteina îl constituie în fiecare caz glicozamina liberă sau acetilată, care serveşte drept receptor pentru fixarea următorului monozaharid. În poziţiile terminale se găsesc *fucoza* (o metilpentoză) şi acidul neuraminic (*sialic*).

O clasificare a glicoproteinelor, după tipul de legătură dintre proteină şi glucidă este:

– tipul I, legătura N-glicozidică (glucid şi reziduul amidic al asparaginei);

– tipul II, legătura O-glicozidică (glucid şi reziduul hidroxilic al treoninei sau al serinei);

– tipul III, legătura O-glicozidică (glucid şi reziduul 5-hidroxilizinei) ce se găseşte în colagen şi în proteinele complementului seric c_1q;

– tipul IV, glucid ataşat la gruparea hidroxil a rezidiului aminoacidului 4-hidroxiprolină;

– tipul V, glucid ataşat lanţului lateral tiolic al cisteinei;

– tipul VI, glucid ataşat de gruparea amino-terminală a lanţului polipeptidic; se formează spontan cu hemoglobina eritrocitară şi glucoza sanguină, în diabetul zaharat netratat.

Glicoproteinele organismului uman au funcţii vitale. Ele joacă rol în fiziologia moleculelor structurale, respectiv cele existente în membranele celulare influenţează comportarea celulelor şi a altor funcţii ale membranei importante biologic (colagenul şi elastina au rol structural în formarea matriţei celulare). De asemenea, ele prezintă importanţă în lubrifierea şi protecţia ţesuturilor existente în ducturile organismului, formând o parte majoră a mucusului secretat de celulele epiteliale.

Glicoproteinele participă de asemenea la procesele de apărare şi recunoaştere. Astfel, imunoglobulinele, factorii sistemului complement, interferonul, după cum am mai arătat, sunt glicoproteine. Ele contribuie la apărarea suprafeţelor intra- şi extracelulare în raport cu unii factori chimici sau mecanici, sau în agresiunile bacteriene sau virale. Recunoaşterea bacterie-celulă, celulă-celulă, virus-celulă are loc tot prin intermediul glicoproteinelor. Gonadotropina corionică sau tirotropina sunt tot glicoproteine, ce funcţionează ca hormoni. Există glicoproteine ce permit transportarea unor compuşi endo- sau exogeni, cum ar fi feritina, ceruloplasmina, haptoglobina etc.

Electroforeza glicoproteinelor în diverse variante (hârtie, acetat de celuloză, gel de acril amidă, agar, amidon etc.) foloseşte cel mai frecvent, coloraţia prin reacţia acid periodic-Schiff (PAS). Glicoproteinele serice se distribuie în 5 fracţiuni electroforetice majore corespunzătoare proteinelor serice.

5.4.5. Lipoproteinele plasmatice

Sistemele lipoproteice (lipoproteine de transport şi sistemele de membrană) sunt complexe de proteine şi lipide unite prin legături necovalente (mai ales interacţii hidrofobe) ce formează un agregat molecular distinct. Cele mai importante clinic sunt lipoproteinele de transport ce se găsesc în plasmă. Ele servesc ca vehicul de transport al lipidelor insolubile în apă, între diferite organe, de la ţesut la ţesut, pe cale sanguină şi participă la metabolismul lipidic; de asemenea au aport în păstrarea compoziţiei lipidice a membranelor şi reglează procese metabolice celulare. Variaţia cantităţilor relative a lipoproteinelor prezice boala majoră umană – ateroscleroza.

Conţinutul normal al plasmei în lipide este între 5-7 g/l (500-700 mg %), cuprinzând diferiţi componenţi lipidici, ale căror cantităţi normale sunt prezentate în tabelul 22.

Tabelul 22

Compoziţia calitativă şi cantitativă lipidică a plasmei

Substanţa	g/l	mmol/l
Lipide totale	5-7	
Colesterol total	1,5-2,4	3,0-6,5
liber	0,45-0,72	0,9-1,95
esterificat	1,05-1,68	2,1-4,55
Fosfolipide	1,2-3,8	1,9-3,5
Trigliceride	0,5-1,5	0,5-1,7
Acizi graşi liberi	0,03-0,09	0,3-0,9

În ciuda acestor concentraţii mari ale lipidelor insolubile în apă, plasma recoltată pe nemâncate este clară, transparentă. Cauza lipsei opalescenţei serului o constituie faptul că lipidele nu sunt prezente în plasmă sub formă liberă, emulsionată, ci sub formă legată lax de proteine, numite *lipoproteine*. Opalescenţa sau lactescenţa serului pledează în fiecare caz pentru prezenţa lipidelor libere emulsionate.

Acizii graşi liberi sau neesterificaţi (AGL, AGNE) reprezintă o fracţiune lipidică deosebit de dinamică a plasmei, a căror însemnătate a fost recent descoperită. Plasma normală conţine între 380-900 μmol/l (30-50 mg/l), sub formă legată labil de albumine. Capacitatea de fixare maximă a albuminelor de AGL este de 10 mmol/l, ceea ce înseamnă pe de o parte că o moleculă de albumină serică poate fixa 10 molecule AGL, iar pe de altă parte, această capacitate în condiţii normale este folosită doar într-o proporţie de 10%. Creşterea în plasmă a cantităţii AGL este totdeauna semnul unei lipolize tisulare accentuate, manifestată în cursul fazei acute a inflamaţiilor şi a leziunilor tisulare grave (infarct miocardic, cerebral şi pulmonar). În cazul unei creşteri excesive a AGL plasmatici, moleculele de albumină, a căror capacitate maximă de a fixa AGL creşte din cauza electronegativităţii marcante a acestora, migrează mai rapid în câmpul electric şi formează pe proteinogramă o *fracţiune prealbuminică* mai mult sau mai puţin decelabilă.

Sursa principală a AGL din plasmă o constituie descompunerea enzimatică a chilomicronilor şi a VLDL (pre-β-LP). Din cauza caracterului puternic amfipatic al săpunurilor lor alcaline, AGL pătrund uşor în celule prin traversarea uşoară a membranelor celulelor. Săpunurile de calciu şi de magneziu ale AGL sunt însă insolubile în apă şi precipită imediat. Din această cauză, *timpul* lor *biologic de înjumătăţire* în plasmă este de numai 2-3 minute. Pe plan metabolic, AGL reprezintă pe de o parte principala sursă de energie a ţesutului muscular striat şi miocardic, iar pe de altă parte substraturile numeroaselor biosinteze (trigliceride, fosfatide, esteri de colesterol, prostaglandine, leucotriene etc.) şi transformări biochimice.

Structura lipoproteinelor

Lipoproteinele sunt structuri sferice complexe, formate din asamblarea unor proteine amfipatice numite *apolipoproteine* şi a diferitelor lipide apolare şi semipolare. Partea polară a apoproteinelor precum şi a lipidelor amfipatice (colesterol liber, fosfolipide) se orientează spre exteriorul moleculelor, lipidele apolare sunt situate în interiorul moleculei. În unele cazuri structura lipidică a sferelor este cavitară, în ea putând fi introduse diferite substanţe hidrosolubile, chiar şi medicamente. Preparatele de acest tip au denumirea de *lipozomi*.

Metodele de fracţionare şi de dozare a lipoproteinelor

Ultracentrifugarea fracţionează lipoproteinele pe baza densităţii lor, care este cu atât mai mică, cu cât cantitatea lipidelor conţinute este mai mare. Spre deosebire de proteinele simple, într-un mediu cu o densitate superioară densităţii lor, lipoproteinele prezintă în cursul ultracentrifugării fenomenul *flotaţiei*, ceea ce înseamnă ridicarea lor în sensul opus forţei centrifuge.

Unitatea de măsură a acestei flotaţii este valoarea Sf (S = Svedberg, f = flotaţie). Tabelul 23 prezintă fracţiunile lipoproteinelor din plasmă în ordinea densităţii, respectiv valorii lor Sf.

Tabelul 23

Densitatea şi cantitatea fracţiunilor lipoproteinice din plasmă

Fracţiune	d	Sf
Chilomicroni	0,95 g/l	200
LP cu densitate foarte mică, VLDL, pre-β	0,95-1,006	100-150
LP intermediară, IDL	1,004-1,010	50-100
LP cu densitate mică, LDL β	0,95-1,006	20-50
LP cu densitate mare, HDL α_1	1,063-1,210	10-20
HDL-1	1,063-1,125	15-20
HDL-2	1,125-1,210	10-15

Pentru scopuri medicale practice, *lipoproteinogramele* serice se obţin cu ajutorul fracţionării electroforetice a lipoproteinelor în gel de agaroză (figura 80). În lipoproteinograma astfel obţinută pot fi bine identificate şi evaluate cantitativ lipoproteinele separate.

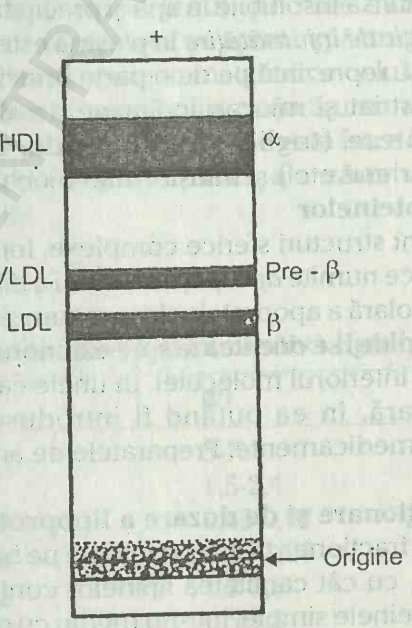


Fig. 80. Separarea electroforetică a lipoproteinelor.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Chilomicronii rămân pe linia de start, LDL migrează împreună cu β-globulinele, VLDL alcătuiesc lipoproteinele pre-β, iar α_1-lipoproteinele reprezintă fracţiunea cea mai rapidă. În urma precolorării serului cu o soluţie apoasă de albastru de Nil sau albastru Victoria, lipidele apolare din lipoproteine se colorează în roşu, iar acizii graşi legaţi labil de albumine în albastru deschis. Lipidograma se poate evalua imediat după terminarea fracţionării.

Apolipoproteinele

Sunt peptide amfipatice cu masa moleculară redusă. Cu diferite lipide formează prin autoasamblare rapidă lipoproteine.

Apo-A I sunt reprezentate de peptide pure, neconţinând glucide, cu masa moleculară de 28 000 d. Ele se formează în hepatocite şi sunt cuprinse în moleculele HDL într-o proporţie de 60-70%.

Apo-A II sunt dipeptide cu masa moleculară de 36 000 d, cu cei doi componenţi cuplaţi prin punţi disulfidice (-S-S-). Ele sunt prezente în particulele HDL într-o proporţie de 30-40%.

Apo-B sunt glicoproteine cu masa moleculară de 38 000 d, care formează partea proteinică caracteristică a LDL (β-lipoproteinelor); în cantităţi reduse se găsesc şi în VLDL (pre-β) precum şi în chilomicroni. Ele se fixează în mod specific pe receptorii LDL ai fibroblaştilor şi adipocitelor, prin care se face posibilă pătrunderea colesterolului, dar şi a grăsimilor neutre, în aceste celule. La bolnavii cu hipercolesterolemie familiară ereditară lipsesc aceşti receptori, din care cauză creşte substanţial în plasmă cantitatea LDL, împreună cu cea a colesterolului şi a trigliceridelor.

Apo(a) este o apolipoproteină macromoleculară şi polimorfă, care în unele cazuri se asociază cu Apo-B în alcătuirea LDL. Polimorfismul Lp(a) se manifestă în existenţa a 6 alotipuri diferite, determinate genetic. În cazul lipsei perechilor de alele funcţionale, Lp(a) lipseşte din moleculele LDL, ceea ce înseamnă reducerea substanţială a heterogenicităţii acestora. Lp(a) prezintă analogii structurale cu molecula plasminogenului. Din această cauză, pe de o parte ea poate adera la resturi de lizină din proteinele membranelor celulare şi astfel poate introduce LDL în celule şi fără prezenţa receptorilor β-lipoproteinice pe suprafaţa acestora. Pe de altă parte, prin analogiile structurale dispuse, poate inhiba plasmina şi ca urmare, poate stimula trombogeneza. Lp(a) este deci un factor de risc, practic independent de parametrii lipidici, îndeosebi pentru scleroza coronariană şi cerebrală.

Apo-C sunt peptide cu masa moleculară de 32 000 d, având trei variante: Apo-C I, Apo-C II şi Apo-C III. Se formează în celulele epiteliale intestinale şi participă la formarea chilomicronilor, VLDL, lipoproteinelor X, iar într-o măsură redusă şi a HDL. Receptorii de membrană ai hepatocitelor recunosc şi extrag din circulaţie rămăşiţele (*remnants*) descompunerii enzimatice (prin acţiunea lipoprotein-lipazei) în plasmă a chilomicronilor şi VLDL, pe baza conţinutului lor în Apo-C.

Apo-D sunt peptide prezente în cantităţi reduse în particulele tuturor tipurilor de lipoproteine cu masa moleculară de 24 000 d.

Lp(a) este o proteină macromoleculară formată din fosfolipide, colesterol şi apolipoproteină B-100, această porţiune fiind identică cu lipoproteinele de joasă densitate care transportă colesterol; restul particulei rămase, care este legată într-un singur punct de apolipoproteina B-100, îi dă proprietăţile distincte. Prezentă în cantităţi mari în sânge, determină un risc crescut pentru bolile de inimă coronariene.

Fracţiunile lipoproteinice

Chilomicronii sunt formele emulsionate în plasmă ale grăsimilor neutre de origine alimentară. Lipsesc din plasma recoltată pe nemâncate, apar însă în cea postprandială, a cărei opalescenţă şi uneori chiar lactescenţa este cauzată de grăsimile emulsionate prezente sub formă de picături de diferite dimensiuni. Picăturile groase cu diametrul între 0,5-1,5 μ sunt vizibile cu microscopul în serul picurat pe o lamă, folosind obiectivul mic. Conţin 1-2% proteine, cu precădere Apo-B şi Apo-C, dar şi cantităţi reduse de Apo-A II, Apo-A I şi Apo-E. În urma descompunerii prin lipoliză a conţinutului lipidic neutru al chilomicronilor, conţinutul lor în proteine creşte, iar dimensiunile lor se reduc treptat. Chilomicronii se descompun în circulaţie sub acţiunea enzimei lipoprotein-lipază, fixată pe suprafaţa internă a celulelor endoteliale.

Lipoproteinele cu densitate foarte mică (*Very Low Density Lipoproteins*, VLDL, pre-β-LP). Se numesc şi *chilomicroni endogeni*, deoarece alături de cantităţi reduse (5-15%) de proteine (Apo-C, dar şi Apo-B, Apo-E şi cantităţi reduse de Apo-A I şi Apo-A II) conţin multe trigliceride şi colesterol liber. Se formează în hepatocite, împreună cu chilomicronii exogeni; sub acţiunea lipoproteinlipazei se descompun treptat în circulaţia periferică. Ele au un rol însemnat în aterogeneză. Conţinutul normal în VLDL al plasmei normale este de circa 5% din cantitatea totală a lipoproteinelor.

Lipoproteinele cu densitate intermediară (*Intermediar Density Lipoproteins*, IDL) se formează în plasma circulantă în urma descompunerii enzimatice a trigliceridelor din chilomicroni şi VLDL. Ele lipsesc din plasma recoltată pe nemâncate, cantitatea lor, însă, creşte în cursul perioadelor postprandiale. O variantă a IDL apare şi în serul bolnavilor cu dislipidemie ereditară de tip III (*boala betei largi, Broad Beta Disease*, BBD). IDL au o perioadă de înjumătăţire în plasmă de câteva ore, se descompun enzimatic ca şi chilomicronii şi VLDL.

Lipoproteinele cu densitate mică (*Low Density Lipoproteins*, LDL, β-LP) conţin din abundenţă trigliceride şi colesterol liber, alături de 17-25% proteine Apo-B produse de hepatocite. Se formează în plasma circulantă, în urma degradării enzimatice a chilomicronilor şi a VLDL. Prin conţinutul lor în Apo-C, capabile să se fixeze în mod specific de receptorii celulari, LDL sunt singurele lipoproteine care pot pătrunde în celule printr-un mecanism activ de pinocitoză (Joseph L. Goldstein şi Michael S. Brown, premiul Nobel pentru medicină, 1985). Colesterolul liber prezent în LDL reprezintă un *risc aterogen* crescut, din care cauză este numit şi *colesterol rău*. Din cantitatea totală a lipoproteinelor, plasma normală conţine 75% β-lipoproteine la bărbaţi şi 70% la femei. Recent s-a descoperit că la unele persoane LDL poate să conţină şi

o altă apoproteină macromoleculară şi polimorfă Lp(a). Având o aderenţă mare la proteinele de membrană ale celulelor, această proteină ajută pătrunderea colesterolului liber din LDL şi în absenţa receptorilor lor specifici. Prezenţa Lp(a) în structura LDL înseamnă totdeauna creşterea riscului aterogen.

Lipoproteinele cu densitate mare (High Density Lipoproteins, lipoproteinele1, HDL) conţin 50-60% proteine, HDL-1 conţine Apo-A I, HDL-2 conţine Apo-A II, iar HDL-3 este o subfracţiune a HDL-2. Toate cele trei variante se formează în hepatocite, cu predominenţa fosfolipidelor. Din acest motiv, în momentul lansării lor în circulaţie au formă elipsoidă. În urma fixării primelor cantităţi de colesterol esterificat, moleculele devin sferice din cauza retragerii colesterolului esterificat apolar în mijlocul particulelor. Colesterolul fixat la periferie este transportat înapoi în ficat de către HDL sub această formă. Tot din această cauză, colesterolul esterificat, vehiculat de HDL, nu reprezintă un risc aterogen, fiind considerat *colesterol bun*. Din totalul lipoproteinelor, în condiţii fiziologice, plasma conţine 25% HDL la bărbaţi şi 30% la femei.

Lipoproteina-X reprezintă o formă patologică a lipoproteinelor, care se formează în hepatocite în cursul unor stări de colestază. Din punct de vedere structural se aseamănă cu LDL, deoarece conţine multe trigliceride şi colesterol liber, dar în locul Apo-B are Apo-C, molecule de albumină, Apo-A I şi Apo-E. În cursul fracţionării electroforetice în gel de agaroză, spre deosebire de celelalte lipoproteine, migrează spre catod. Lp-X apare în ser şi în cazul lipsei congenitale a enzimei *lecitin-colesterol-acil-transferazei* (LCAT).

Tipurile de dislipidemie

Pe baza modificărilor cantitative ale lipidelor din plasmă precum şi a standardizării metodei fracţionării electroforetice a lipoproteinelor în gel de agaroză, D. S. Frederickson a formulat, în 1967, *tipurile de dislipidemie* ereditară şi dobândită, prezentate în tabelul 24, respectiv în figura 81.

Transformările enzimatice în plasma circulantă ale lipoproteinelor

În cursul transportului lor sanguin, lipoproteinele suferă multiple transformări sub acţiunea diferitelor enzime:

a) *Lipoprotein-lipaza* (LPL, *factorul de clarificare a plasmei*) se formează în celulele endoteliale şi este ancorată în membranele lor, spre interiorul vaselor. Enzima are masa moleculară de 34 000-73 000 d şi este activată de Apo-C II în prezenţa heparinei, care are funcţia de *cofactor*. Ionii Cl^- au un efect inhibitor asupra enzimei.

Tabelul 24

Modificarea cantitativă a fracţiunilor lipidice şi a conţinutului lor lipidic în cadrul tipurilor de dislipidemie, după *Frederickson*

Tip	Denumirea	Ser.	Fr.	LT.	Tg.	Col.	Simptome
I.	Hiperchilomicronemie ereditară	+++	CM	+++	+++	++	xantoame, steatoză hepatică
IIa.	Hipercolesterolemie ereditară	clar	LDL,β	++	N	+++	xantoame tuberoase
IIb.	Hipercolesterolemie cu hipertrigliceridemie	+ clar	LDL,β VLDL	++	++	++	inflamaţie microvasculară
III.	Boala fracţiunii beta largi ereditară	clar +++	LDL+ VLDL	+++	+++	+++	xantoame eruptive
IV.	Hiper-pre-β-lipo proteinemie (ereditară)	+	VLDL	+++	+++	+	hepatomegalie, xantoame
V.	Forma mixtă ereditară	+++	CM, LDL VLDL	+++	+++	+++	adipozitate, xantoame

(Ser: aspectul serului, Fr: fracţiunea LP, LT: lipide totale, Tg: trigliceride, Col: colesterol, N: normal, +, ++, +++: intensitatea tulburescenţei).

Enzima descompune trigliceridele din chilomicronii exogeni şi endogeni (VLDL, pre-β-LP), fixaţi temporar pe suprafaţa internă a endoteliului. Acizii graşi eliberaţi în urma lipolizei pe de o parte se fixează labil de albumine şi sunt transportaţi în plasmă sub această formă, iar pe de altă parte pătrund în celule unde se metabolizează. În cursul lipolizei are loc şi micşorarea treptată a dimensiunilor particulelor chilomicronilor şi ale VLDL. În urma fixării Apo-B, produşii de degradare ai acestora (*remnants*), prin intermediul IDL, se transformă în LDL (β-LP).

b) *Triglicerid-lipaza hepatică* (TGL-H) este localizată pe suprafaţa hepatocitelor. Aceasta descompune la fel trigliceridele din chilomicronii, mai ales exogeni, transportaţi în ficat prin sângele portal. Se activează de asemenea în prezenţa cofactorului heparină, dar nu are nevoie şi de prezenţa Apo-C II.

c) *Lecitina-colesterol-acil-transferaza* (LCAT) se formează în hepatocite şi este excretată în plasmă. Enzima descompune parţial fosfolipidele (cu precădere moleculele de lecitină) din membranele celulelor periferice, orientate spre exterior, prin eliberarea şi fixarea temporară a unei molecule de acid gras. Acidul gras fixat îl transferă pe o moleculă de colesterol liber din apropiere, prin esterificarea grupării hidroxilice de la atomul de carbon C_3. Colesterolul esterificat îşi pierde caracterul amfipatic, şi ca un component perfect apolar se deplasează prin alunecare în miezul unei molecule de HDL.

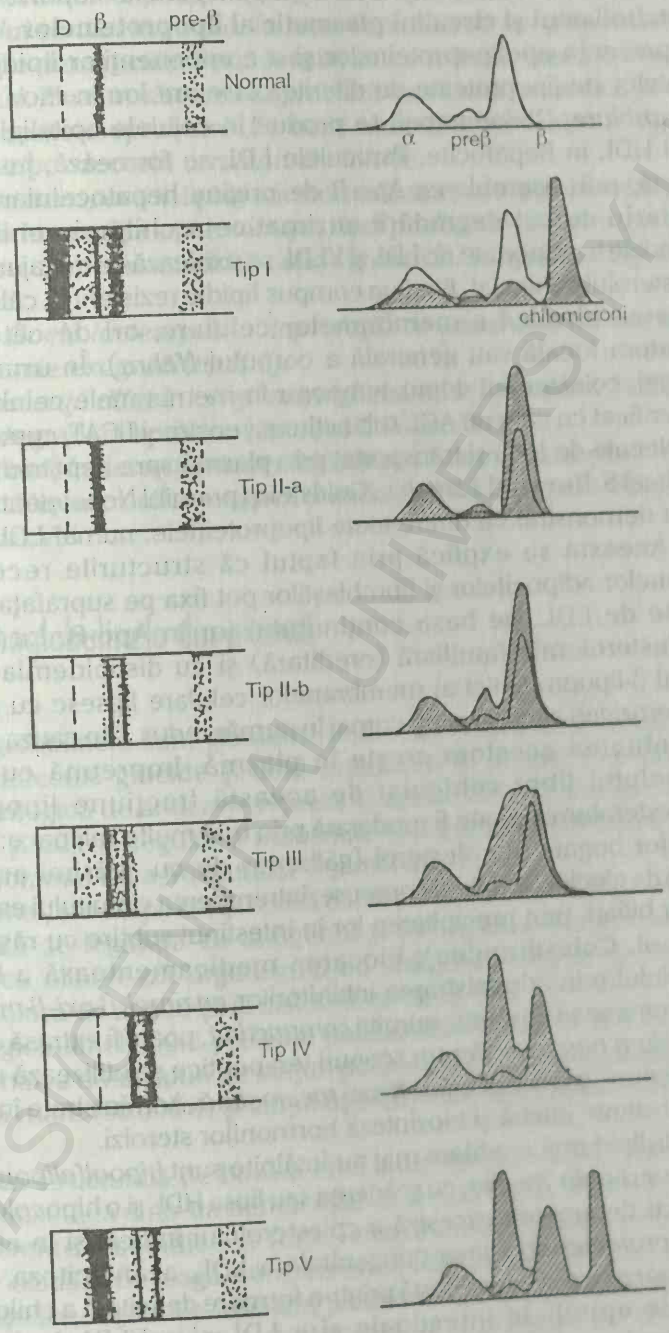


Fig. 81. Profilele lipidogramelor în hiperlipoproteinemiile familiale.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sub această formă ambalată şi izolată prin învelişul proteinic al HDL, moleculele de colesterol esterificat sunt transportate înapoi la hepatocite.

Metabolismul şi circuitul plasmatic al lipoproteinelor

În prezenţa apolipoproteinelor şi a componenţilor lipidici, formarea moleculelor de lipoproteine de diferite clase are loc în mod spontan prin *autoasamblare*. Chilomicronii se produc în celulele epiteliale intestinale, VLDL şi HDL în hepatocite. Particulele LDL se formează, însă, în plasma circulantă, prin asamblarea Apo-B de origine hepatocelulară cu lipidele eliberate în cursul degradării enzimatice a chilomicronilor şi VLDL. Trigliceridele transportate de LDL şi VLDL se oxidează cu degajare de căldură, iar colesterolul vehiculat, fiind un compus lipidic rezistent la căldură, asigură stabilizarea termică a membranelor celulare, ori de câte ori creşte temperatura locală sau generală a corpului (*febra*). În urma vindecării inflamaţiei, colesterolul depus temporar în membranele celulare din zonă este esterificat cu câte un AGL sub acţiunea enzimei LCAT, cuprins în miezul unei molecule de HDL şi transportat prin plasmă spre hepatocite.

Michael S. Brown şi Joseph L. Goldstein (premiul Nobel pentru medicină, 1985) au demonstrat că dintre toate lipoproteinele, numai LDL pot intra în celule. Aceasta se explică prin faptul că structurile receptoare ale membranelor adipocitelor şi fibroblaştilor pot fixa pe suprafaţa lor exclusiv molecule de LDL, pe baza conţinutului lor în Apo-B. La bolnavii cu hipercolesterolemie familiară (ereditară) şi cu dislipidemia de tip II a, receptorii β-lipoproteinici ai membranelor celulare lipsesc cu desăvârşire, iar la heterozigoţi sunt prezenţi numai în număr redus. Din cauza neextragerii LDL, cantitatea acestora creşte în plasmă, împreună cu cantitatea colesterolului liber vehiculat de această fracţiune lipoproteinică. Hipercolesterolemia poate fi moderată prin mai multe mijloace: excluderea alimentelor bogate în colesterol (gălbenuş de ou, grăsimi animale) şi a excesului de glucide simple şi compuse; întreruperea circuitului enterohepatic al acizilor biliari, prin precipitarea lor în intestinul subţire cu răşini sintetice (Colestipol, Colestiramina); blocarea medicamentoasă a biosintezei colesterolului prin administrarea inhibitorilor *enzimei β-oxi-β-metil-glutaril-CoA*. O asemenea substanţă, numită *compactină*, poate fi extrasă din culturile de *Penicillium notatum*. Pentru scopuri terapeutice se utilizează unii derivaţi ai compactinei, ca *monacolina-K* sau *mevinolină*. Administrate în doze mari, aceste substanţe inhibă şi biosinteza hormonilor steroizi.

Alte dislipidemii ereditare mai rar întâlnite sunt *hipoalfalipoproteinemia familiară* sau *boala Tangier*, cu scăderea sau lipsa HDL şi o hipocolesterolemie asociată cu depunerea excesivă a colesterolului în ficat şi în alte ţesuturi. *Abetalipoproteinemia* (lipsa congenitală a LDL, acantocitoza, *sindromul Bassen-Kornzweig*) se manifestă printr-o formare deficitară a chilomicronilor în celulele epiteliale intestinale şi a LDL şi a VLDL în hepatocite. Colesterolemia şi trigliceridemia sunt scăzute. La bolnavii afectaţi se manifestă diferite tulburări neuropsihice şi retinită pigmentoasă. Pe frotiul colorat, hematiile se prezintă sub forma caracteristică a acantocitozei.

Diferenţierea simplă şi rapidă a dislipidemiilor

Tipul dislipidemiilor poate fi estimat cu o aproximaţie destul de bună cu ajutorul *testului serului depozitat la rece*. Pentru acest scop se recoltează 5-10 ml sânge pe nemâncate. Serul format se pune în frigider într-o eprubetă aşezată vertical. Ziua următoare se apreciază transparenţa serului, pe un fond întunecat în spatele eprubetei. Pe baza absenţei, prezenţei şi aspectului tulburenţei, se pot deosebi următoarele forme:

a) *Ser clar, transparent*: lipidemie normală sau prezenţa unei dislipidemii, care nu duce la apariţia opalescenţei, deci *posibilitatea existenţei tipurilor IIa, IIb şi IV*, cu creşterea cantităţii colesterolului (LDL) şi/sau a trigliceridelor (VLDL) serice.

b) *Strat (inel) lactescent la suprafaţă, cu serul inferior transparent*: chilomicronemie exogenă (*tipul I*).

c) *Opalescenţă difuză*: creşterea trigliceridelor endogene (VLDL) sau a rămăşiţelor degradării lipidelor (tipurile III, IV sau IIb).

d) *Strat (inel) lactescent la suprafaţă, cu serul inferior lactescent*: creşterea simultană a chilomicronilor exogeni şi endogeni (VLDL); prezenţa posibilă a tipurilor III sau V.

5.4.6. Imunoglobulinele din plasmă

Imunoglobulinele sunt globuline serice cu structura de bază similară, având în moleculă glucide şi fiind sintetizate în plasmocite. Ele posedă activitate biologică de anticorp, reprezintă aprox. 20% din totalul proteinelor plasmatice şi au, de regulă, o mobilitate electroforetică similară fracţiunii γ-globulinelor, mai rar a fracţiunilor β şi mai ales α.

Funcţional, anticorpii conţin două domenii: domeniul de legătură, regiune responsabilă de legătura cu antigenul şi domeniul efector, care iniţiază procesele ce eliberează organismul de antigenele legate de anticorpi şi determină clasa de anticorpi şi distribuirea lor în corp.

Imunoglobulinele sunt proteine policatenare rezultate din combinarea după Edelman a două tipuri de lanţuri polipeptidice: lanţul greu (H) cu masă moleculară mare (50 000 d) şi lanţul uşor (L) cu masă moleculară mai mică (23 000 d).

Unitatea structurală de bază a unui anticorp se referă la un monomer, deşi este constituită dintr-un număr egal de lanţuri H şi L, legate între ele prin punţi covalente disulfidice şi forţe necovalente (legături de hidrogen). Legăturile disulfidice leagă de asemenea lanţurile grele între ele, uneori lanţurile uşoare, legăturile intralanţ jucând rol în împărţirea anticorpilor în domenii structurale (C_H1, C_H2, C_H3). Lanţurile H şi L prezintă două regiuni: una variabilă (V), conţinând porţiunea amino-terminală şi una constantă (C), porţiunea carboxi-terminală, ce are o structură similară la anticorpii aceleiaşi clase. Regiunile variabile ale perechilor lanţurilor L şi H sunt adiacente una

alteia şi formează locul de legare a anticorpului cu antigenul. Secvenţa aminoacidică a regiunii variabile este unicul determinant al specificităţii de legare a unui anticorp cu un antigen. Regiunea constantă cuprinde domeniul efector. În regiunea variabilă există subregiuni ce manifestă secvenţă de aminoacizi cu variabilitate mare. Acestea sunt primele ce răspund de legătura cu antigenul şi se numesc regiuni hipervariabile sau determinante de complementaritate.

Dualitatea particulară a structurii moleculei de imunoglobulină prin prezenţa acestor două regiuni implică atât existenţa a două gene destinate sintezei fiecărui lanţ, cât şi a unei evidenţe structurale privind bifuncţionalitatea moleculei, care pe de-o parte recunoaşte şi se leagă specific cu antigenul şi pe de altă parte, efectuează o varietate de procese.

Lanţul greu poate fi de 5 tipuri, ceea ce dă şi denumirea imunoglobulinei: α pentru IgA, γ pentru IgG, μ pentru IgM, δ pentru IgD, ε pentru IgE. Lanţul uşor este de două tipuri: kappa (κ) şi lambda (λ), primul predominând ca proporţie. O moleculă de imunoglobulină conţine numai unul din aceste tipuri, fiecare asociindu-se cu oricare clasă de lanţ greu.

Lanţul H este format dintr-un domeniu variabil V_H şi 3 domenii constante C_H1, C_H2, C_H3, iar lanţul L dintr-un domeniu variabil V_L şi unul constant C_L.

În vecinătatea legăturii disulfidice, care uneşte lanţurile H, între domeniile C_H1 şi C_H2 se află regiunea „balama" care favorizează structura flexibilă a moleculei de imunoglobulină şi susceptibilitatea sa faţă de proteoliza enzimatică. Papaina acţionează la nivelul regiunii „balama" şi scindează molecula de IgG în zona amino-terminală a legăturii disulfidice interlanţ, în fragmentul Fab (fragment fixator de antigen) ce include domeniile constante ale lanţurilor L şi parţial H (C_H1, C_L) şi fragmentul F_C (fragment cristazilabil) format din jumătăţile carboxiterminale ale lanţurilor H (figura 82).

Digestia cu pepsină duce la formarea unui fragment mai mare F(ab')2 constituit din două unităţi Fab şi regiunea „balama" cu fragmentul Fc. Fragmentul Fab se poate scinda la rândul său în porţiuni ce cuprind domeniile variabile VL şi VH (fragmentul FV) şi cele constante CL şi CH1. Porţiunea lanţului H prezentă în fragmentul Fab (VH+CH1) constituie fragmentul Fd. Prin acţiunea plasminei se obţine fragmentul Facb căruia îi lipsesc domeniile CH3 ale celor două lanţuri H.

Legăturile disulfidice (-S-S-) sunt situate între lanţuri (între H şi H, între H şi L, între L şi L) şi au importanţă în ceea ce priveşte structura tridimensională a imunoglobulinei. Pe lângă lanţurile H şi L, mai există şi un lanţ J, care se află în imunoglobulinele polimerice (IgA dimer sau trimer, IgM pentamer). El este constituit dintr-un lanţ glicopeptidic mic, cu proprietăţi acide şi include o enzimă ce catalizează reacţia de schimb disulfidic (-S-S- $\rightleftarrows$ SH-). Se pare că lanţul J dacă nu determină polimerizarea unităţilor monomerice de imunoglobulină, în orice caz o favorizează.

Fiecare imunoglobulină este produsul unei singure familii sau clone de plasmocite. Multe clone diferite sunt implicate în răspunsul specific al anticorpului, dar numai o clonă va sintetiza şi secreta o regiune particulară

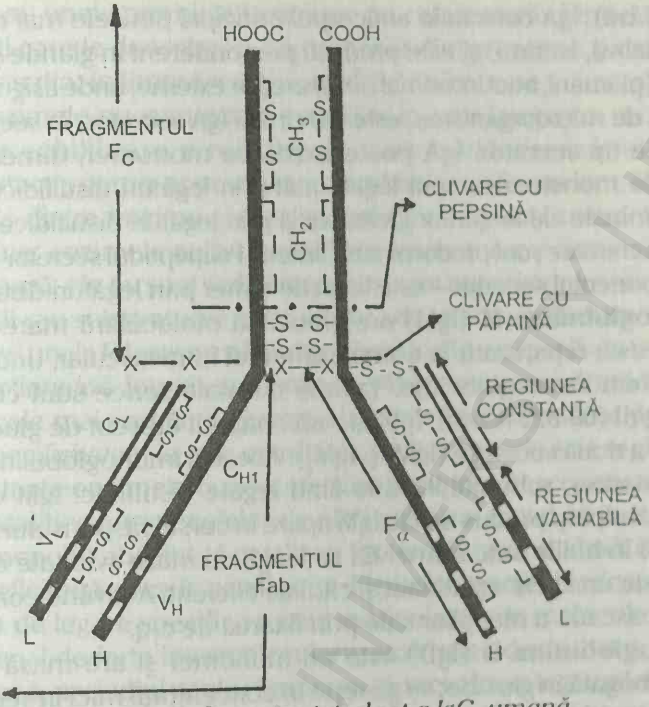


Fig. 82. Structura tetralanţ a IgG_1 umană.

de V_H şi V_L. Proliferarea malignă a unei singure clone de plasmocite duce la producerea crescută de molecule de imunoglobuline de clasă, subclasă, regiuni V_H şi V_L identice. Astfel de imunoglobuline monoclonale (paraproteine sau componenţi „M") au o secvenţă aminoacidică unică şi o mobilitate electroforetică finită. O clasă de imunoglobuline serice este policlonală, când are în compoziţia sa specificităţi anticorpice diferite, ce sunt sintetizate de diverse clone de celule.

Imunoglobulina G (IgG) are masa moleculară aprox. de 150 000 d, reprezintă până la 75% din totalul imunoglobulinelor serice la om şi este repartizată aproape egal între compartimentele intra- şi extravasculare. Concentraţia sa serică este de 800-1800 mg/dl (92-207 IU/ml). Această imunoglobulină prezintă 4 subclase: IgG_1 (70%), IgG_2 (20%), IgG_3 (8%), IgG_4 (2%). Lanţul γ conţine două oligozaharide. Anticorpii IgG apar în special în timpul răspunsului imun secundar şi pot exercita o acţiune de inhibare asupra sintezei anticorpilor IgM. Difuzând uşor în spaţiile extravasculare, IgG are rolul de a neutraliza toxinele bacteriene şi de a se lega de microorganisme pentru a uşura fagocitarea lor. Imunoglobulina G este singura clasă de imunoglobuline ce poate traversa placenta; subclasele IgG sunt responsabile pentru apărarea majoră imună umorală a nou-născuţilor în primele luni de viaţă, înaintea dezvoltării anticorpilor proprii.

Imunoglobulina A (IgA) reprezintă până la 20% din imunoglobulinele serice, are greutatea moleculară analoagă IgG şi apare sub formă de două subclase (IgA_1 şi IgA_2). Concentraţia sa serică este de 90-450 mg/dl

(54-268 IU/ml). IgA constituie anticorpul principal din cele mai multe secreţii externe (salivă, lacrimi) şi este produsă preponderent în glande şi membrane mucoase (plămâni, tract intestinal). În secreţiile externe, unde asigură imunitatea locală faţă de microorganisme, este denumită IgA secretor; în secreţiile interne nu este de tip secretor. IgA poate exista ca monomer, dimer sau trimer. Subunităţile monomerice sunt legate atât prin legături disulfidice la capetele COOH-terminale ale lanţurilor grele, cât şi prin legături disulfidice de un lanţ J. Formele secretoare sunt predominant dimerii. Polipeptidul secretor din IgA secretor – componentul secretor – este legat de dimer prin legături disulfidice.

Imunoglobulina M (IgM) are greutatea moleculară mare (până la un milion) şi este repartizată în compartimentul intravascular, unde reprezintă circa 10% din imunoglobuline. Valorile normale serice sunt cuprinse între 60-280 mg/dl (69-322 IU/ml). IgM are un conţinut crescut de glucide şi apare sub forma a două subclase (IgM_1 şi IgM_2). Această imunoglobulină se prezintă ca un pentamer, subunităţile sale fiind legate disulfidic. IgM este cel mai abundent anticorp produs de făt. IgM apare în cursul răspunsului imun primar şi joacă rol în bolile autoimune. Ea se leagă cu mare aviditate de bacterii şi virusuri, este un agent aglutinant şi citolitic eficient. Activând complementul, iniţiază o cascadă a reacţiilor sale prin fixarea de c_1q.

Imunoglobulina D (IgD) este un monomer şi are masa moleculară 180 000 d, bogată în glucide; se găseşte în concentraţii mici în ser (< 1%), dar creşte la gravide şi în timpul travaliului. Moleculelor de IgD li s-au atribuit rolul de receptor „timpuriu" al limfocitelor, în special la făt şi nou-născut, uşurând stimularea lor pentru diviziune şi diferenţiere.

Imunoglobulina E (IgE) denumită şi anticorp homocitocropic sau reaginic, are greutatea moleculară de 180 000 d. Ea se găseşte în cantitatea cea mai mică în ser (0,004%) şi răspunde de hipersensibilitatea imediată de tip anafilactic. IgE apare în ţesuturile splinei, amigdalelor, a adenoizilor şi în membranele mucoase ale plămânilor şi ale tractului gastro-intestinal. IgE se ataşează la receptorii de membrană de pe celulele omoloage circulante (bazofile, plachete) sau fixe (mastocitele din derm) şi induce eliberarea histaminei şi a altor factori activi fiziologic. Combinându-se cu antigene specifice (alergene) pe suprafaţa acestor celule, ea se implică în degranularea mastocitelor cu formarea de mediatori farmacologici responsabili pentru reacţiile expunerii pielii alergicilor la alergene. IgE participă la activarea complementului, regularizează transferul placentar şi controlul catabolismului, legarea de macrofage şi mastocite şi reactivitatea faţă de factorul reumatoid.

5.4.7. Enzimele din plasmă

Enzimele sunt catalizatorii sistemelor biologice, un dispozitiv remarcabil, care determină modelul transformărilor chimice. De asemenea ele mediază transformarea diferitelor forme de energie.

Enzimele au unele proprietăţi comune cu catalizatorii chimici, dar au şi alte proprietăţi care le deosebesc. *Asemănările* dintre enzime şi catalizatorii chimici constau din: în timpul reacţiei, enzimele nici nu se consumă, nici nu se produc; enzimele nu sunt cauza reacţiilor la care iau parte, nu schimbă constanta de echilibrare a reacţiei pe care o catalizează, ele numai accelerează reacţia care s-ar produce în mod obişnuit foarte lent, în absenţa lor. *Diferenţele* dintre enzime şi catalizatorii chimici sunt: enzimele sunt în special proteine; enzimele au o specificitate foarte mare pentru reacţiile pe care le catalizează, ele nu sunt sediul reacţiei şi scot numai produsele aşteptate de la reactanţii sau substraturile date; ele au adesea o specificitate mare faţă de substrat, deşi unele folosesc mai multe substraturi (au o specificitate limitată); enzimele funcţionează într-un domeniu de pH şi temperatură moderate. Cu alte cuvinte, cele mai pregnante caracteristici ale enzimelor sunt puterea lor catalitică şi specificitatea. În plus activitatea multor enzime este reglată.

Aproape toate enzimele cunoscute sunt proteine. Descoperirea recentă a activităţii catalitice a moleculelor de ARN a indicat faptul că proteinele nu au totuşi monopolul absolut al catalizei. Proteinele sunt o clasă de macromolecule cu eficienţă mare în catalizarea diferitelor reacţii chimice, din cauza capacităţii lor de legare specifică a unui mare număr de molecule. Folosind un întreg arsenal de forţe intermoleculare, enzimele aduc substanţele într-o orientare optimă, preludiul pentru formarea sau scindarea legăturilor chimice. În esenţă; ele catalizează reacţiile prin stabilizarea stării de tranziţie. În felul acesta, enzimele determină care dintre potenţialele chimice multiple ale reacţiei se va produce. Datorită capacităţii lor de a cupla acţiunile la centre de legare separate, enzimele pot acţiona ca schimbători în reglarea activităţii catalitice şi în transmiterea de energie.

Enzimele au o putere catalitică imensă; ele accelerează reacţiile de cel puţin un milion de ori. Chiar o reacţie foarte simplă, ca cea a hidratării dioxidului de carbon, este catalizată enzimatic de către carbonic anhidraza. Transferul de CO_2 de la ţesut la sânge şi apoi în aerul alveolar ar fi incomplet în absenţa acestei enzime. Fiecare moleculă de enzimă poate hidrata 10^5 molecule de CO_2 pe secundă. Această reacţie catalizată de enzimă este de 10 ori mai rapidă decât o reacţie necatalizată.

Enzimele au o specificitate mare, atât în reacţiile pe care le catalizează, cât şi în alegerea reactanţilor denumiţi substraturi. O enzimă catalizează de obicei o singură reacţie chimică, sau un set de reacţii înrudite. Gradul specificităţii pentru substraturi este de obicei mare şi în unele cazuri virtual absolut. De ex: enzimele proteolitice catalizează hidroliza legăturii peptidice. Multe enzime proteolitice catalizează de asemenea hidroliza unei legături ester, o reacţie înrudită, dar diferită de legătura peptidică. Enzimele proteolitice diferă în gradul de specificitate de substrat. Astfel, *subtilizina*, o enzimă ce provine din unele bacterii, este nediscriminatorie în ceea ce priveşte sediul legăturii peptidice pe care o va cliva. *Chimotripsina* hidrolizează preferenţial legăturile peptidice în care grupul carboxil este furnizat de aminoacizii aromatici fenilalanina, tirozina sau triptofanul. *Tripsina* catalizează ruperea

legăturilor peptidice numai la capătul carboxil al reziduului lizină şi arginină. *Trombina*, o enzimă care participă la coagularea sângelui, este mai specifică decât tripsina. Ea catalizează hidroliza legăturilor Arg-Gli, numai în secvenţa peptidică specifică. Carboxipeptidazele şi aminopeptidazele scindează aminoacizii de la capătul aminoterminal al lanţului polipeptidic.

Deşi unele oxidoreductaze funcţionează la fel de bine cu NAD sau NADP ca acceptori de electroni, multe dintre ele folosesc preferenţial unul sau altul. Astfel, oxidoreductazele, enzime implicate în procesele de biosinteză (în sinteza acizilor graşi), tind să folosească NAD ca oxidant. Un ţesut poate să aibă două oxidoreductaze care să difere numai în privinţa specificităţii faţă de coenzime: NAD sau NADP. Un exemplu este NAD sau NADP izocitric dehidrogenazele specifice din ficatul de şobolan. În ficat, 90% din enzima NADP specifică este extramitocondrială. Aceasta poate fi implicată în procesele de biosinteză ca enzimă NAD specifică. În mitocondrie este activată specific de ADP; dacă concentraţia de ADP creşte în urma consumului de ATP, fluxul spre ciclul acidului citric este susţinut de activarea enzimei mitocondriale NAD specifice.

Un catalizator cu o specificitate foarte mare este ADN polimeraza I. Secvenţa nucleotidelor din lanţul ADN, care va fi sintetizat, este determinată de secvenţa nucleotidelor din alt lanţ ADN care serveşte de şablon. ADN polimeraza are o precizie remarcabilă în îndeplinirea instrucţiunilor date de şablon. Un nucleotid este inserat greşit într-un lanţ de ADN, mai puţin decât unu la un milion de ori, deoarece ADN polimeraza controlează produsul în formare şi corectează greşelile.

Examinarea atentă a activităţii enzimelor relevă faptul că multe dintre ele pot cataliza acelaşi tip de reacţie (transferul de fosfat oxidoreducere etc.) cu mai multe substraturi structural înrudite. Reacţiile cu substraturi alternante se produc frecvent, dacă ele sunt prezente în concentraţie mare. Faptul că este posibil să se producă acest fel de reacţii în organismul viu, depinde, în parte, de concentraţia substratului şi de afinitatea lui pentru enzimă.

Aceste aspecte generale includ pe lângă specificitatea de grup amintită mai sus şi o specificitate optică. Cu excepţia epimerazei (racemazei) care interconverteşte izomerii optici, enzimele arată în general o specificitate optică absolută pentru cel puţin o porţiune a moleculei de substrat. Astfel, maltaza catalizează hidroliza unui α şi nu β glucozid, în timp ce enzimele din calea Embden-Meyerhof şi din calea oxidativă catalizează interconversia D şi nu a L-fosfoglucidelor. Cu puţine excepţii (cum este D aminoacidoxidaza din rinichi), marea majoritate a enzimelor din organismul mamiferelor acţionează asupra L-izomerilor aminoacizilor. Alte forme de viaţă pot avea enzime cu specificitate egală pentru D-aminoacizi. Specificitatea optică se poate extinde la o porţiune a moleculei sau la întreaga moleculă. Exemple pentru aceste două posibilităţi sunt furnizate de glicozidaze. Aceste enzime, care catalizează legăturile glicozidice între glucide şi alcooli sunt înalt specifice pentru porţiunea glucidică şi pentru legătura alfa sau beta, dar relativ nespecifice pentru porţiunea alcool.

Activităţile catalitice ale multor enzime sunt reglate. Enzima care catalizează prima etapă din calea biosintezei unui produs, este inhibată de ultimul produs. Biosinteza izoleucinei în bacterie ilustrează acest tip de control, care se numeşte *inhibiţie feedback* (inhibiţie cu produsul final) (figura 83).

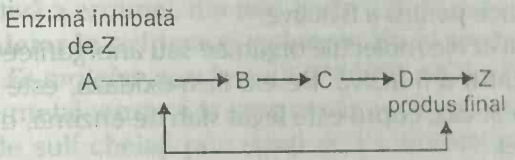


Fig. 83. Inhibiţia feedback a primei enzime dintr-o cale metabolică prin legarea reversibilă a produsului final.

Treonina este convertită în izoleucină în cinci etape. Prima etapă este catalizată de o treonin-deaminaza. Această enzimă este inhibată când concentraţia de izoleucină este suficient de mare. Izoleucina inhibă reacţia prin legarea sa de enzimă la un centru reglator distinct de cel catalitic. Inhibiţia este o *interacţie alosterică reversibilă*. Când concentraţia de izoleucină scade suficient, treonin-deaminaza devine activă din nou şi în consecinţă se sintetizează mai multă izoleucină.

Enzimele sunt de asemenea controlate prin *proteine reglatoare*, care pot să le stimuleze sau să le inhibe. Activitatea multor enzime este reglată de calmodulină, o proteină de 17 Kd, care serveşte ca un senzor de calciu în aproape toate celulele eucariote. Legarea Ca^{2+} la patru *situs*-uri din calmodulină induce formarea alfa helixului şi alte schimbări conformaţionale, care o transformă dintr-o formă inactivă într-una activă. Calmodulina activată se leagă atunci de multe enzime şi alte proteine din celulă şi le modifică activitatea.

Al treilea mecanism de reglare a activităţii enzimei este *modificarea covalentă*. De ex. activitatea enzimelor care sintetizează şi degradează glicogenul este reglată de ataşarea unei grupări fosforil la un reziduu specific de serină.

Alte enzime sunt controlate de fosforilarea treoninei şi a reziduurilor tirozinei. Aceste modificări sunt reversibile prin hidroliza legăturilor ester-fosfat. Enzimele specifice catalizează ataşarea şi îndepărtarea grupelor fosforil şi a altor grupe. Unele enzime sunt sintetizate într-o formă de precursor inactiv, care este activat la un loc şi un timp fiziologic potrivit. Acest fel de control, denumit *activare proteolitică*, este exemplificat de enzimele digestive. De ex: tripsinogenul este sintetizat în pancreas ca precursor şi este activat în intestinul subţire prin clivarea legăturilor peptidice, pentru a forma enzima activă, tripsina. Precursorii inactivi ai enzimelor proteolitice sunt numiţi *zimogeni*. Acest tip de control este folosit şi în secvenţa de reacţii enzimatice care duce la coagularea sângelui.

Ajunşi la acest punct, este necesar să facem unele precizări în ceea ce priveşte structura enzimei:

Apoenzima este partea proteică a enzimei, fără cofactorii sau grupările prostetice solicitate de enzimă pentru a fi funcţional activă. Deci, apoenzima este inactivă din punct de vedere catalitic. Nu toate enzimele solicită cofactori sau grupări prostetice pentru a fi active.

Cofactorii sunt acele molecule organice sau anorganice mici pe care le solicită enzima pentru a fi activă. De ex: lizin-oxidaza, este o enzimă care solicită Cu^{2+}. În acest caz, cuprul este legat slab de enzimă, dar este solicitat pentru activitatea ei.

Gruparea prostetică este similară cu cofactorul, dar este strâns legată de apoenzimă. De ex: la citocromi, gruparea prostetică (hemul) este foarte strâns legată de apoenzimă şi sunt necesari acizi puternici pentru a o disocia de citocrom.

Adăugarea cofactorului sau grupării prostetice la apoenzimă ne dă *holoenzima*, care este enzima activă. Moleculele asupra cărora acţionează enzima pentru a forma un produs reprezintă *substratul*. Deoarece multe reacţii sunt reversibile, produsele reacţiei anterioare vor deveni substraturi ale reacţiei inverse.

Importanţa metal-cofactorilor pentru activitatea enzimei. Metalele nu sunt coenzime în sensul FAD sau NAD^+, dar sunt solicitate drept cofactori de aproximativ 2/3 din enzime. Cofactorii participă la reacţiile enzimatice datorită uşurinţei de a forma chelaţi (complexe organo-metalice). Un bun exemplu de complex chelat este cel dintre fier şi porfirină, pentru a forma hemul. Metalele care iau parte la cataliză prin formarea de chelaţi sunt: Zn, Fe, Mn şi Cu. Acestea au un electron orbital d liber, care acţionează ca electron de pătrundere (metalele Na şi K nu au această uşurinţă). Carbonic-oxidaza este o enzimă care acţionează pe acest principiu. Metalele favorizează de asemenea cataliza, fie prin legarea substratului la centrul activ, fie prin stabilizarea intermediarilor din calea metabolică. Acest dublu rol al metalului este bine ilustrat de carboxipeptidaza, o Zn-enzimă.

Rolul metalului ca element structural. Formarea de compuşi chelaţi este foarte importantă. Sunt diferite feluri de chelare între metal, enzimă şi substrat. Exemplul cel mai bun este creatinkinaza, la care substratul adevărat nu este ATP ci Mg^{2+}-ATP. În acest caz, Mg nu interacţionează direct cu enzima, ci serveşte ca să neutralizeze încărcătura negativă a moleculei de ATP şi să îi faciliteze legarea de enzimă. Complexele ternare a acestei conformaţii sunt cunoscute sub numele de complexe „punte-substrat" şi pot fi reprezentate astfel: Enz-S-M. În piruvat-kinaza, Mg^{2+} serveşte la chelarea moleculei de ATP la enzimă. Absenţa cofactorului metal duce la eşecul moleculei de ATP de a se lega la enzimă. Toate metaloenzimele sunt de acest tip.

Metaloproteinele sunt enzime ce conţin o legătură puternică cu metale ca Zn^{2+} sau Fe^{2+}. Metalele se pot lega direct la enzimă pentru a-i stabiliza conformaţia activă sau pentru a induce formarea unui centru de legare sau centru activ. În această privinţă, un rol important îl au nu numai ionii metalelor

puternic chelatoare ca Mg^{2+}, ci şi a metalelor alcaline legate slab ca Na^+ sau K^+. În piruvatkinază, K^+ induce o schimbare conformaţională iniţială, care este necesară (dar nu suficientă) pentru formarea complexului ternar, activ catalitic. După legarea substratului, K^+ induce o a doua modificare conformaţională a complexului ternar activ catalitic şi în acest fel stabilizează conformaţia activă a enzimei, dar este pasiv faţă de centrul catalitic.

Rolul metalelor în oxidare şi reducere. Enzimele Fe-S sunt cunoscute sub numele de *Fe-proteine non-hem (NONHEME IRON PROTEINE)*. Acestea sunt o clasă de metaloenzime la care centrul activ constă din unul sau mai mulţi clusteri de sulf chelaţi prin punţi de Fe. Aceste formaţiuni sunt mai specifice la bacterii şi plante, decât în celulele mamiferelor. Reprezentanţii acestui grup sunt sistemele succinatdehidrogenaza, NADH dehidrogenaza şi adrenodoxina.

Citocromii care sunt hem-Fe proteine funcţionează ca substraturi pentru reductazele lor. Fe din hemul citocromilor ia parte la transferul de electroni. Deci, în citocromi metalul are nu numai un rol structural, dar de asemenea participă la evenimente chimice.

Coenzimele – structură şi funcţie

Coenzimele funcţionează împreună cu enzimele în procesele de cataliză. Adesea, coenzima are o afinitate pentru enzimă, similară cu cea pentru substrat; în consecinţă coenzima poate fi considerată un al doilea substrat. În alte cazuri coenzima este legată covalent la enzimă şi funcţionează în cataliză la/sau lângă centrul activ.

Multe coenzime, dar nu toate, sunt sintetizate de la vitaminele B. Vitamina B_6, piridoxina, solicită o modificare mică pentru a fi transformată în coenzima activă piridoxal fosfat. Spre deosebire de vitamina B_6, niacina solicită o modificare majoră pentru a fi capabilă să acţioneze ca o coenzimă.

Adenozin trifosfatul (ATP) funcţionează adesea ca un al doilea substrat şi poate servi de asemenea de cofactor în modularea activităţii unei enzime specifice. ATP poate fi sintetizat de novo în celulele tuturor mamiferelor. Inelul heterociclic este adenina, la care este ataşat ribozil-5'-trifosfatul. Capătul funcţional al moleculei este trifosfatul, care se află în stare ionizată. ATP este utilizat ca un cosubstrat de către kinaze, pentru transferul fosfatului terminal la diferiţi acceptori. Un exemplu tipic este reacţia catalizată de glucokinaze.

$$\text{Glucoza} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucoza 6-fosfat} + \text{ADP}$$

ATP, în afară de rolul de cosubstrat mai are şi alt rol, anume serveşte ca modulator al activităţii enzimei. În acest caz ATP acţionează mecanic ca un efector alosteric. ADP este adenozin difosfatul, combinaţia adeninei cu ribozo-adenozina.

Niacina este acidul piridin 3-carboxilic. El este convertit în două coenzime majore, care sunt implicate în clasa de oxido-reductaze. Aceste coenzime sunt *NAD* (nicotinamid adenin dinucleotid) şi *NADP* (nicotinamid adenin dinucleotidfosfat). S-a convenit să se folosească abrevierile NAD şi NADP

atunci când ne referim la coenzime, indiferent de starea de oxidare sau de reducere; NAD^+ şi $NADP^+$ reprezintă forma oxidată, iar NADH şi NADPH reprezintă forma redusă. Unele dehidrogenaze funcţionează cu NADP drept coenzimă, dar nu cu NAD. De asemenea sunt şi enzime care funcţionează cu ambele coenzime. Un astfel de aranjament permite controlul dehidrogenazelor din aceleaşi compartimente celulare. Cele două coenzime funcţionează ca intermediari în transferul a doi electroni, între un donor de electroni şi un acceptor. Nu este nevoie ca donorul şi acceptorul de electroni să fie implicaţi în aceeaşi cale metabolică. Cu alte cuvinte, forma redusă a acestor nucleotide acţionează ca un rezervor de electroni, care apar din multe reacţii oxidative şi pot fi folosiţi în diferite reacţii reductive. Componentele reprezentate de adenină, riboză şi pirofosfatul moleculei de NAD sunt implicate în legarea moleculei de NAD la enzimă. Enzimele care solicită NADP au o regiune cationică specifică la centrul de legare a NADP, care este poziţionată în aşa fel, încât formează o legătură ionică cu fosfatul 2' de pe molecula NADP. Acest fapt măreşte legarea moleculei de NADP la enzimă şi NADP este preferat faţă de NAD de aceste enzime speciale.

Riboflavina are două coenzime: *FMN* (flavin mononucleotid) şi *FAD* (flavin adenin dinucleotid). Atât FAD, cât şi FMN funcţionează în reacţiile de oxido-reducere, acceptând şi donând câte $2e^-$ prin inelul izoaloxazin. Un exemplu tipic de participare a FAD într-o reacţie enzimatică este oxidarea succinatului la fumarat de către enzima succinat dehidrogenaza. În acest caz, coenzima (FAD) acceptă $1e^-$ care duce la formarea unei semiquinone (un radical liber). O particularitate a coenzimelor flavinei este tendinţa de a se lega mai strâns de enzimele lor, decât coenzimele niacinei şi atunci ele funcţionează mai degrabă ca grupări prostetice decât drept cofactori.

Coenzimele pot fi clasificate în multe feluri, fiecare clasificare subliniind tipul de reacţie în care este funcţională coenzima.

a. Coenzime implicate în transferul de grupe, altele decât H: ATP şi ceilalţi derivaţi (ADP, AMP); fosfoglucide; CoA; tiamin pirofosfat; B_6 fosfat; coenzimele folat; biotina; coenzimele cobamid (B_{12}); acidul lipoic.

b. Coenzimele implicate în transferul de H: NAD, NADP; FMN, FAD; acidul lipoic; coenzima Q.

Enzimele au o mare specificitate. De exemplu: glucozo-oxidaza va oxida numai glucoza, nu şi galactoza. Această specificitate este localizată într-o regiune specială de pe suprafaţa enzimei, numită centrul de legare a substratului, care constă dintr-un aranjament special al grupelor chimice, alcătuit în aşa fel încât să lege specific un substrat. Acest centru de legare se poate integra în centrul activ al enzimei. În unele cazuri, centrul activ poate să nu fie în interiorul centrului de legare a substratului, dar poate fi învecinat cu acesta în structura primară. În alte cazuri, centrul activ şi centrul de legare a substratului se află în regiuni distante în secvenţa primară, dar devin apropiate prin plierea structurii terţiare. Centrul activ conţine grupările chimice speciale care sunt implicate în catalizarea reacţiei. Grupările chimice impli-

cate atât în legarea substratului, cât şi în catalizare fac parte adesea din lanţurile de aminoacizi ai apoenzimei.

În unele cazuri sunt forme diferite ale aceleiaşi enzime, denumite izoenzime sau izozime. Aceste izoenzime se deosebesc electroforetic şi prin alte proprietăţi, dar toate catalizează aceeaşi reacţie chimică.

În unele enzime, este o altă zonă de molecule chimice, centrul alosteric, care nu este la centrul activ sau la centrul de legare a substratului, ci se găseşte în altă parte a moleculei. Centrul alosteric este locul unde se leagă molecule mici, având ca efect o schimbare a centrului activ sau al celui de legare a substratului. Legarea unei molecule organice speciale, mici, la centrul alosteric produce o schimbare a conformaţiei enzimei, care o poate face mai activă sau mai puţin activă. Aceste interacţii sunt implicate în reglarea activităţii enzimelor.

Clasificarea enzimelor

Uniunea Internaţională a Biochimiştilor (IUB) a stabilit un sistem prin care toate enzimele sunt plasate într-una din cele 6 clase majore, fiecare cu 4-13 subclase.

Numele enzimei are două părţi: prima parte este numele substratului sau substraturilor. A doua parte, terminându-se în sufixul ază, ataşat direct la numele substratului, indică tipul de reacţie catalizată.

Dacă este nevoie de informaţii adiţionale pentru a clarifica natura reacţiei, aceasta poate urma în paranteze. Ex: o enzimă care catalizează reacţia:

$$\text{L.malat} + NAD^+ \rightleftarrows \text{piruvat} + CO_2 + NADH + H^+,$$

cunoscută sub numele de enzima malică, va fi notată cu 1.1.1.37: L.malat: NAD oxido-reductaza (decarboxilaza).

Fiecare enzimă are un număr de cod sistemic (E.C.). Acest număr caracterizează tipul (clasa) de reacţie (primul număr), subclasa (al doilea număr) şi sub-subclasa (al treilea număr). Al patrulea număr este pentru denumirea specială. Ex. E.C.2.7.1.1 înseamnă clasa 2 (transferaza), subclasa 7 (transfer de fosfat), sub-subclasa 1 (o funcţie alcool ca acceptor de fosfat). Cifra finală indică enzima: hexokinaza sau ATP: D-hexozo - 6 - fosfotransferaza, o enzimă care catalizează transferul grupării fosfat de la ATP la gruparea hidroxil a carbonului 6 al glucozei.

Pe scurt, cele 6 clase de enzime sunt:

1. OXIDOREDUCTAZE – enzime implicate în reacţii de oxidare şi reducere.
2. TRANSFERAZE – transfer de grupe funcţionale (ex: grupe amino sau fosfat) între donori şi acceptori.
3. HIDROLAZE – transferă apa – ele catalizează hidroliza substratului.
4. LIAZE – adaugă sau îndepărtează elemente ca: apa, amoniacul sau dioxidul de carbon (CO_2) la/sau de la dubla legătură.
5. IZOMERAZE – catalizează schimbările în interiorul moleculei; include: racemazele şi mutazele ca şi epimerazele, cis-trans izomerazele, oxido-reductazele intramoleculare, transferazele intramoleculare şi liazele intramoleculare.

6. LIGAZE (SINTETAZE) – unesc împreună două molecule cu consumul unei legături fosfat înalt energetice de ATP.

Tabelul 25

Clasele şi subclasele importante de enzime

1. *OXIDOREDUCTAZE*	2. *TRANSFERAZE*
Dehidrogenaze	Transaldolaze şi transcetolaze
Oxidaze	Acil-, metil-, glucozil- şi
Reductaze	fosforil-transferaze
Peroxidaze	Kinaze
Catalaze	Fosfomutaze
Oxigenaze	
Hidroxilaze	
3. *HIDROLAZE*	4. *LIAZE*
Esteraze	Decarboxilaze
Glicozidaze	Aldolaze
Peptidaze	Hidrataze
Fosfataze	Dehidrataze
Tiolaze	Sintaze
Fosfolipaze	Liaze
Amidaze	
Deaminaze	
Ribonucleaze	
5. *IZOMERAZE*	6. *LIGAZE*
Racemaze	Sintetaze
Epimeraze	Carboxilaze
Izomeraze	
Mutaze (nu toate)	

Modul de acţiune a enzimelor. Enzimele transformă diferite forme de energie

Energia multor reacţii chimice este convertită cu mare eficienţă într-o formă diferită. În fotosinteză, energia luminii (solară) este convertită într-o energie chimică. În mitocondrii, energia liberă provenită din alimente este convertită în energia liberă a ATP. Legătura chimică înalt energetică a ATP este apoi utilizată în mod diferit. Ex: în contracţia musculară, energia din ATP este convertită în energie mecanică. Celulele şi organele au „pompe" care utilizează energia din ATP pentru a transporta moleculele şi ionii peste

gradienţi chimici şi electrici. Aceste transformări ale energiei sunt îndeplinite de moleculele de enzimă, care sunt parte integrantă a unor ansambluri înalt organizate.

În biochimie, cea mai folositoare funcţie din termodinamică este cea a *energiei libere*.

Prima lege a termodinamicii stipulează că energia totală a unui sistem şi a mediului său înconjurător este o constantă. Cu alte cuvinte energia este conservată. Expresia matematică a acestei legi este:

$\Delta E = E_B - E_A = Q - W_1$(1),

în care E_A este energia unui sistem la startul procesului şi E_B la sfârşitul procesului. Q este căldura absorbită de sistem şi W_1 este lucrul făcut de sistem. O trăsătură importantă a ecuaţiei este aceea că *schimbul în energia unui sistem depinde numai de starea iniţială şi finală şi nu de calea transformării*. Prima lege a dinamicii nu poate fi folosită pentru a preciza dacă reacţia se poate produce spontan, deşi ΔE este pozitiv (energia sistemului creşte). În acest caz, sistemul absoarbe căldură din mediul înconjurător.

Este evident că trebuie solicitată o funcţie diferită de ΔE. Această funcţie este entropia (S) care este o măsură a gradului de hazard. Entropia unui sistem creşte, când acesta devine mai dezordonat. Legea a doua a termodinamicii stabileşte că un proces se poate produce spontan, numai dacă suma entropiei sistemului şi mediului înconjurător creşte.

S sistem + ΔS mediul înconjurător > 0 pentru un proces spontan(2)

Se observă că entropia sistemului poate descreşte în timpul unui proces spontan, prevăzând că energia mediului creşte, aşa încât suma lor este pozitivă. De ex: formarea unei structuri biologice înalt organizate este posibilă din punct de vedere termodinamic, deoarece descreşterea entropiei unui astfel de sistem este mai mare decât cea compensată de creşterea entropiei mediului.

O dificultate în folosirea entropiei drept criteriu, dacă un proces biochimic se poate produce spontan, este acela că schimbările entropiei reacţiilor chimice nu sunt măsurate uşor. Mai mult, criteriul de spontaneitate dat de ecuaţia (2) solicită ca ambele schimbări de entropie (a mediului şi cea a sistemului) să fie cunoscute. Aceste dificultăţi sunt eludate prin folosirea unor funcţii termodinamice numite *energia liberă*, notată cu simbolul G (sau F în altă literatură).

Desiah Willard Gibbs a creat funcţia energiei libere, prin combinarea primei şi celei de a doua legi a termodinamicii.

Ecuaţia de bază este:

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$(3)

în care ΔG este schimbul de energie liberă a unui sistem care suferă o transformare la presiune (P) şi temperatură (T) constante, ΔH este schimbarea entalpiei acestui sistem şi ΔS este schimbarea în entropia lui.

Se observă că proprietăţile mediului nu intră în această ecuaţie. Schimbarea entalpiei este dată de ecuaţia:

$\Delta H = \Delta E + \Delta P\ \Delta V$(4)

Schimbarea de volum V este mică pentru aproape toate reacţiile biochimice, aşa încât H este aproape egală cu E, deci:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S \quad (5)$$

În acest caz, G a reacţiei depinde atât de schimbarea energiei interne, cât şi de schimbările entropiei sistemului.

Schimbarea energiei libere (ΔG) a reacţiei este un criteriu valabil pentru a vedea dacă o reacţie se poate produce spontan: o reacţie se poate produce spontan numai dacă ΔG este negativ; un sistem este la echilibru şi nici o schimbare netă nu are loc dacă ΔG este zero; o reacţie nu se poate produce spontan dacă ΔG este pozitiv. Pentru ca această reacţie să poată continua este solicitat un aport de energie.

Trebuie să subliniem aici două puncte adiţionale: ΔG a reacţiei depinde numai de energia liberă a produselor (starea finală) minus aceea a reactanţilor (starea iniţială). Energia liberă a reacţiei (ΔG) este independentă de calea (sau mecanismul molecular) transformării. De ex: ΔG pentru oxidarea glucozei la CO_2 şi H_2O este aceeaşi, fie că se produce prin arderea în *vitro* sau printr-o serie de etape catalizate de multe enzime în interiorul celulei. Apoi, ΔG nu furnizează informaţii despre viteza cu care se produce reacţia. Un G negativ, indică faptul că o reacţie se poate produce spontan, dar nu arată dacă aceasta se va produce cu o viteză perceptibilă. Viteza unei reacţii depinde de energia liberă de activare ($\Delta G^{\ddagger}$) care nu are legătură cu G.

Standardul schimbului energiei libere a unei reacţii şi legătura ei cu constanta de echilibru

Considerăm reacţia:

$$A + B \rightleftarrows C + D$$

ΔG din această reacţie este dată de ecuaţia:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}, \quad (6)$$

în care ΔG° este standardul schimbului de energie liberă, R este constanta gazului, T este temperatura absolută şi [A][B][C] şi [D] sunt concentraţiile moleculare, mai precis activitatea reactanţilor.

ΔG° este schimbul de energie liberă a reactanţilor în condiţii standard. Condiţiile standard sunt acelea în care fiecare dintre reactanţii A, B, C şi D sunt prezenţi la concentraţia de 1,0 M (iar pentru gaz starea standard este aleasă să fie de 1 atm). În aceste condiţii, ΔG a reacţiei depinde de natura reactanţilor (exprimată prin termenul de ΔG° al ecuaţiei 6) şi de concentraţia lor (exprimată în termenul logaritmic al ecuaţiei 6).

Pentru a simplifica calcularea energiei libere în reacţiile biochimice a fost adoptată o convenţie: starea standard este definită a avea pH = 7. În consecinţă, atunci când H^+ este reactant, activitatea sa are valoarea corespunzătoare pH-ului 7. De asemenea, activitatea apei este considerată a

fi = 1. Schimbul standard de energie este notată cu simbolul $\Delta G^{\circ'}$ şi va fi folosit în toate notările, iar ca unitate de energie va fi folosită kilocaloria.

Legătura dintre energia liberă standard şi constanta de echilibru a reacţiei poate fi derivată cu uşurinţă.

La echilibru, $\Delta G = 0$, ecuaţia (6) devine:

$$0 = \Delta G^{\circ'} + RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (7)$$

astfel:

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (8)$$

Constanta de echilibru în condiţii standard K'eq este definită ca:

$$K'eq = \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (9)$$

Substituind ecuaţia (9) în ecuaţia (8) avem:

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \log K'eq \quad (10)$$

$$\Delta G^{\circ'} = 2{,}303\ RT \log_{10} K'eq \quad (11)$$

care rearanjată dă:

$$K'eq = 10^{-\Delta G^{\circ'}/2{,}303\ RT} \quad (12)$$

Substituind $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ Kcal mol^{-1} log^{-1} şi T = 298°K corespunzătoare la 25°C avem:

$$K'eq = 10^{-\Delta G^{\circ'}/1{,}36} \quad (13)$$

în care $\Delta G^{\circ'}$ este exprimată în Kcal/mol. Atunci, energia liberă standard şi constanta de echilibru ale unei reacţii sunt redate printr-o expresie simplă. De ex: Să calculăm $\Delta G^{\circ'}$ şi ΔG pentru reacţia de izomerizare a dihidroxiaceton-fosfatului în gliceraldehida 3-fosfat, reacţie care se produce în glicoliză. La echilibru, raportul gliceraldehida 3-fosfat/dihidroxiaceton-fosfat este 0,0475 la 25°C (298°K) şi pH = 7, deci: K'eq = 0,0475. Schimbul de energie liberă standard pentru această reacţie se poate calcula din formula (11):

$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ'} &= -2{,}303\ RT \log_{10} K'eq \\ &= -2{,}303 \times 1{,}98 \times 10^{-3} \times 298 \times \log_{10} (0{,}0475) \\ &= +1{,}8\ \text{Kcal/mol} \end{aligned}$$

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Să calculăm acum G pentru această reacţie în care concentraţia iniţială a dihidroxiaceton-fosfatului este $2x10^{-4}$ M şi concentraţia iniţială a gliceraldehid 3-fosfatului este $3x10^{-6}$ M. Înlocuind aceste valori în ecuaţia (6) vom avea:

$$\Delta G = 1{,}8 \text{ Kcal/mol} + 2{,}303\ RT \log_{10} \frac{3x10^{-6}\ M}{2x10^{-4}\ M}$$

$$= 1{,}8 \text{ Kcal/mol} - 2{,}5 \text{ Kcal/mol} = -0{,}7 \text{ Kcal/mol}$$

Această valoare negativă pentru ΔG arată că izomerizarea dihidroxiaceton-fosfatului în gliceraldehida 3-fosfat se poate produce spontan, când aceste substanţe sunt prezente la concentraţiile de mai sus. Este de observat că G pentru această reacţie este negativă, deşi $\Delta G^{\circ'}$ este pozitivă. Este important să accentuăm că dacă valoarea ΔG pentru o reacţie este mai mare, mai mică sau aceeaşi ca valoare cu $\Delta G^{\circ'}$, aceasta depinde de concentraţia reactanţilor. Criteriul pentru spontaneitatea reacţiei este ΔG şi nu $\Delta G^{\circ'}$.

Enzimele nu modifică echilibrul reacţiei. Enzima este un catalizator şi în consecinţă nu poate modifica echilibrul chimic al reacţiei. Aceasta înseamnă că enzima accelerează mersul înainte sau reversul reacţiei prin acelaşi factor precis. Să considerăm interconversia substratului A în B. Să presupunem că în absenţa enzimei, constanta vitezei de înaintare a reacţiei (K_F) este $10^{-4}S^{-1}$, iar reversul reacţiei are constanta (K_R) = $10^{-6}S^{-1}$.

Constanta de echilibru K este dată de raportul acestor două viteze constante.

$$A = \underset{10^{-6}S^{-1}}{\overset{10^{-4}S^{-1}}{\rightleftharpoons}} B$$

$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{K_F}{K_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

La echilibru, concentraţia substratului B este de 100 ori mai mare decât a substratului A, indiferent dacă enzima este sau nu prezentă. Cu toate acestea, pentru a atinge acest echilibru fără enzimă este necesar mai mult de o oră, în timp ce în prezenţa enzimei echilibrul este atins într-o secundă. Deci, enzimele accelerează atingerea echilibrului, dar nu schimbă poziţiile lor.

Enzimele accelerează reacţiile prin stabilizarea stărilor de tranziţie. Reacţia chimică a substratului S pentru a forma produsul P trece prin starea de tranziţie $S^{\ddagger}$, care are o energie liberă mai mare decât S sau P.

$$S \underset{}{\overset{KF}{\rightleftharpoons}} S^{\ddagger} \overset{V}{\rightleftharpoons} P$$

substrat — stare de tranziţie — produs

Starea de tranziţie are cea mai mare energie liberă. Energia liberă de activare, notată de Gibbs $G^{\ddagger}$ este egală cu diferenţa de energie liberă dintre starea de tranziţie şi substrat, care arată o cantitate termodinamică a stării de tranziţie.

$$G^{\ddagger} = G_{s}{}^{\ddagger} - G_{s}$$

Viteza de reacţie V este proporţională cu concentraţia $S^{\ddagger}$, care depinde de $G^{\ddagger}$, deoarece acesta este în echilibru cu S. Enzimele accelerează reacţiile prin descreşterea ΔG, bariera de activare.

Combinarea substratului cu enzima, creează o cale de reacţie nouă a cărei energie de tranziţie este mai mică decât a reacţiilor în absenţa enzimei. Cataliza este legată în esenţă de starea de tranziţie (figura 84).

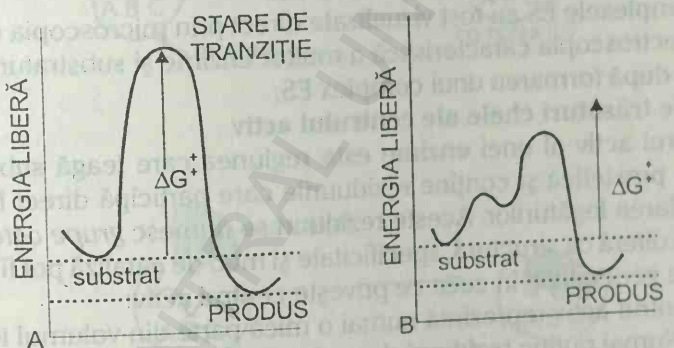


Fig. 84. Modul de acţiune a enzimelor.
A = reacţie necatalizată de enzimă;
B = reacţie catalizată de enzimă.

Prima etapă a catalizei enzimatice este formarea unui complex enzimă-substrat. Mare parte din puterea catalitică a enzimelor provine de la orientarea favorabilă a substratului în complexul enzimă-substrat [ES]. Substratele sunt legate într-o regiune specifică a enzimei, numită centrul activ. Multe enzime sunt foarte selective în legarea substraturilor. Mai mult, activitatea unor enzime este controlată în acest stadiu. Existenţa complexelor ES poate fi pusă în evidenţă prin mai multe căi:

– La o concentraţie constantă a enzimei, viteza de reacţie creşte cu creşterea concentraţiei de substrat, până ce este atinsă viteza maximă (figura 85).

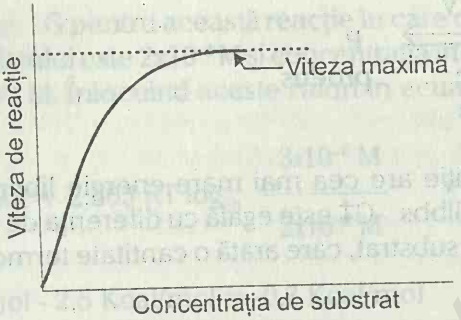


Fig. 85. Dependenţa vitezei de reacţie a enzimei de concentraţia de substrat.

În contrast, reacţiile necatalizate nu prezintă acest efect de saturare. În anul 1943, Leonor Michaelis a interpretat viteza maximă a unei reacţii catalizate de enzimă în termenii formării unui complex ES. La o concentraţie suficient de mare de substrat, *situs*-urile catalitice sunt umplute şi astfel viteza de reacţie atinge un maximum. Deşi indirect, aceasta este cea mai veche evidenţă despre existenţa complexului ES.

– Complexele ES au fost vizualizate direct prin microscopia electronică.

– Spectroscopia caracteristică a multor enzime şi substraturi singure se schimbă după formarea unui complex ES.

Unele trăsături cheie ale centrului activ

Centrul activ al unei enzime este regiunea care leagă substraturile şi gruparea prostetică şi conţine reziduurile care participă direct la formarea sau scindarea legăturilor. Aceste reziduuri se numesc *grupe catalitice*. Deşi enzimele diferă ca structură, specificitate şi mod de cataliză pot fi stabilite un număr de generalităţi în ceea ce priveşte centrul activ:

a. Centrul activ reprezintă numai o mică parte din volumul total al unei enzime. Numai puţine reziduuri de aminoacizi dintr-o enzimă vin în contact cu substraturile, deşi aproape toate enzimele sunt făcute din mai mult de 100 reziduuri de aminoacizi.

b. Centrul activ este o entitate tridimensională formată din grupe de aminoacizi care vin din diferite părţi ale secvenţei lineare. Într-adevăr, reziduuri separate, ca fiind departe unele de altele în secvenţa lineară, pot interacţiona mai puternic decât reziduurile adiacente din secvenţa de aminoacizi, aşa cum s-a văzut la mioglobină şi hemoglobină. În lizozim, grupări importante în centrul activ sunt date de reziduurile 35, 52, 62, 63 şi 101 din secvenţa lineară de 129 aminoacizi.

c. Substraturile sunt legate la enzime prin forţe multiple de atracţie, slabe (interacţiunile noncovalente în complexele ES au energia liberă cuprinsă între -3 şi -12 Kcal/mol, spre deosebire de legăturile covalente care au energia liberă cuprinsă între -50 şi -110 Kcal/mol). Interacţiunile reversibile ale biomoleculelor sunt mediate prin legături electrostatice, legături de H, forţe van der Waals şi

interacţiuni hidrofobe. Pe de altă parte, enzimele şi substraturile au o conformaţie complementară. Caracterul direcţional al legăturilor de hidrogen dintre enzime şi substraturi au un grad de specificitate mare.

d. Centrele active sunt dispuse în adâncituri sau şanţuri din care apa este exclusă, în afară de cazul când este reactant. Caracterul nonpolar al multor şanţuri creşte legarea de substrat. Cu toate acestea, şanţurile pot conţine şi reziduuri polare, fapt care creează un micromediu în care unele reziduuri dobândesc proprietăţi speciale.

e. Specificitatea legării depinde de aranjamentul atomilor în centrul activ. Pentru a adera la centrul activ, substratul trebuie să prezinte o formă potrivită. Emil Fischer se exprimă cu metafora „lacăt şi cheie". Cu toate acestea este mai evident că forma centrului activ al unor enzime este modificat de legarea substratului, cum a postulat Daniel E. Koshland (Jr.) în anul 1958 şi anume că centrele active ale enzimelor au forme complementare cu cele ale substraturilor, numai după ce substratul a fost legat. Acest proces este o recunoaştere dinamică şi se numeşte „potrivire indusă" (figura 86).

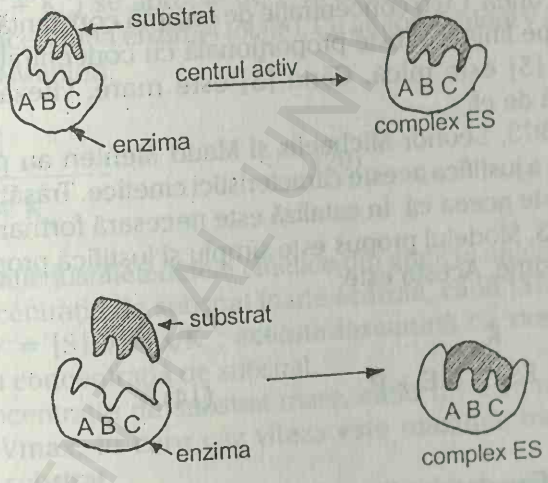


Fig. 86. Modele de interacţiune ale enzimei cu substratul.
Sus — Modelul Fischer (model lacăt şi cheie) în care centrul activ al enzimei singure este complementar ca formă cu cel al substratului.
Jos — Modelul Koshland al "formei induse", în care centrul activ are o formă complementară cu cea a substratului, numai după ce substratul a fost legat; enzima îşi schimbă forma după legarea de substrat.

Pentru multe enzime, viteza de reacţie (V) variază cu concentraţia de substrat (S) (figura 87).

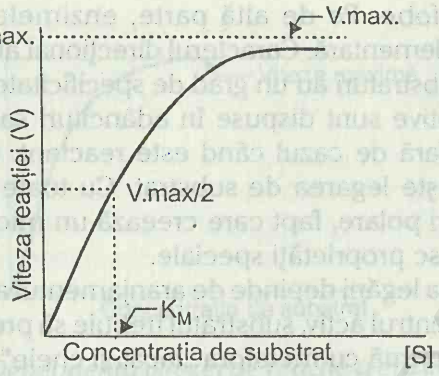


Fig. 87. Graficul vitezei de reacţie (V) funcţie de concentraţia substratului pentru o enzimă ce ascultă de cinetica Michaelis-Menten. Vmax = viteza maximă, KM = constanta Michaelis.

Viteza de reacţie (V) este definită ca numărul de molecule de produs format pe secundă. Cu o concentraţie de enzimă constantă, viteza de reacţie V, este aproape liniară şi este proporţională cu concentraţia de substrat [S] atunci când [S] este mică. Când [S] este mare, viteza V este aproape independentă de el.

În anul 1913, Leonor Michaelis şi Maud Menten au propus un model simplu pentru a justifica aceste caracteristici cinetice. Trăsătura caracteristică a teoriei lor este aceea că în cataliză este necesară formarea unui complex intermediar ES. Modelul propus este simplu şi justifică proprietăţile cinetice ale multor enzime. Acesta este:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{K_3} E + P \qquad (14)$$

O enzimă E se combină cu substratul S pentru a forma complexul ES cu o viteză constantă K_1. Complexul are două posibilităţi: se poate disocia în E şi S cu o viteză constantă K_2, sau poate continua pentru a forma produsul P cu o viteză constantă K_3. Se presupune că aproape nici un produs nu revine la substratul iniţial, fapt care ar putea fi posibil în stadiul incipient al unei reacţii înainte ca acesta să fie în cantitate mare.

Avem nevoie de o expresie care să lege viteza catalizei de concentraţiile substratului şi enzimei, ca şi de vitezele etapelor individuale. Punctul de plecare este acela că viteza catalizei este egală cu produsul dintre concentraţia complexului ES şi K_3:

$$V = K_3 . [ES] \qquad (15)$$

Viteza formării şi scindării complexului ES este dată de:

a) Viteza de formare a complexului $ES = K_1[E][S]$ (16)

b) Viteza de scindare a complexului $ES = (K_2 + K_3)[ES]$ (17)

Viteza de cataliză în condiţii de echilibru este posibil să fie cunoscută atunci când viteza de formare a complexului ES este egală cu viteza de scindare a lui. Deci:

$$K_1[E][S] = (K_2 + K_3)[ES] \qquad (18)$$

Prin rearanjări şi simplificări, putem defini o nouă constantă, constanta Michaelis:

$$K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \qquad (19)$$

Viteza maximă (V max) a reacţiei este atinsă atunci când centrele active ale enzimei (*situs*-urile enzimei) sunt saturate cu substrat şi aceasta se produce atunci când concentraţia de substrat [S] este mult mai mare decât K_M aşa încât $[S]/([S] + K_M)$ se apropie de 1. În acest caz, V max. $= K_3[ET]$ (în care [ET] este concentraţia enzimei totale). Cu ajutorul valorii V max. obţinem ecuaţia Michaelis-Menten.

$$V = Vmax. \frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (20)$$

Această ecuaţie justifică datele cinetice din graficul anterior:

a) La o concentraţie de substrat foarte scăzută, când [S] este mult mai mic decât K_M, $V = [S]\ Vmax/K_M$; aceasta înseamnă că viteza este direct proporţională cu concentraţia de substrat.

b) La o concentraţie de substrat mare, când [S] este mult mai mare decât K_M, V = Vmax. în care caz viteza este maximă, independent de concentraţia de substrat.

c) Când substratul $[S] = K_M$, atunci V = Vmax/2. În acest caz K_M este egală cu concentraţia de substrat la care viteza de reacţie este jumătate din valoarea sa maximă.

Constanta Michaelis (K_M) şi viteza maximă (Vmax.) pot fi derivate cu uşurinţă din viteza de cataliză măsurată cu diferite concentraţii de substrat, dacă enzima acţionează potrivit schemei simple dată de ecuaţia (14).

Este convenabil să transformăm ecuaţia Michaelis-Menten într-o ecuaţie a cărei proiecţie să fie o linie dreaptă. Acest lucru poate fi obţinut luând reciproca celor două părţi ale ecuaţiei 20, care dă:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{Vmax.} + \frac{K_M}{Vmax.} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Proiecţia 1/*V versus* 1/[S], numită şi proiecţia Lineweaver Buck este o dreaptă cu o intersecţie 1/Vmax. şi o pantă K_M/Vmax. (figura 88).

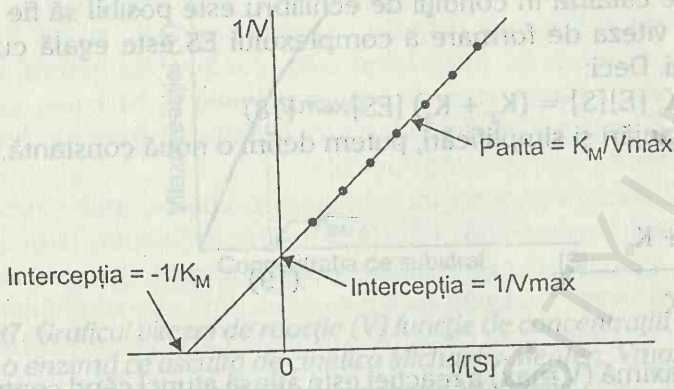


Fig. 88. Proiecţia dublei reciproce a cineticii enzimatice (1/V proiectat funcţie de 1/[S]). Panta = K_M/Vmax; intercepţia pe axa verticală = 1/Vmax; intercepţia pe axa orizontală = - 1/K_M

Tabelul 26

Valorile K_M ale unor enzime

Enzima	Substrat	Valoarea K_M
Chimotripsina	acetil-1-triptofanamida	5000
Lizozim	hexa-N-acetilglucozamina	6
Beta-galactozidaza	lactoza	4000
Treonin-deamidaza	treonina	6000
Carbonic anhidraza	CO_2	8000
Penicilinaza	benzil penicilin	80
Piruvat carboxilaza	piruvat	400
	HCO_3	1000
	ATP	80
Arginin ARNt sintetaza	Arginina	3
	ARNt	0,4
	ATP	300

Semnificaţia valorilor K_M şi Vmax.

Pentru multe enzime, valoarea K_M este situată între 10^{-1} şi 10^{-7} M. Valoarea K_M pentru enzimă depinde de substratul specific şi de condiţiile de mediu ca: pH, temperatură şi forţă ionică.

Constanta Michaelis (K_M) are două semnificaţii: K_M reprezintă concentraţia substratului la care o jumătate din centrele active sunt saturate; K_M are legătură cu constantele vitezelor fiecărei etape în parte, din ecuaţia:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_3} E + P$$

În ecuaţia (19) K_M este definit $(K_2 + K_3)/K_1$. Să considerăm un caz limită în care K_2 este mult mai mare decât K_3. Aceasta înseamnă că disocierea complexului ES în E şi S este mult mai rapidă decât formarea E şi produsului. În aceste condiţii $(K_2 > K_3)$,

$$K_M = \frac{K_2}{K_1}$$

Constanta de disociere a complexului ES este dată de:

$$K_{ES} = \frac{[E]\cdot[S]}{[E]} = \frac{K_2}{K_1}$$

Cu alte cuvinte, K_M este egal cu constanta de disociere a complexului ES, dacă V_3 este mult mai mic decât K_2. Când aceste condiţii sunt îndeplinite, K_M este o măsură a forţei de legare a complexului ES.

Un K_M mare indică o legare slabă, iar un K_M mic indică o legare puternică. Trebuie accentuat faptul că valoarea K_M indică afinitatea complexului ES numai când K_2 este mult mai mare decât K_3.

Numărul turnover al enzimei este numărul moleculelor de substrat convertite în produs de către o moleculă de enzimă într-o unitate de timp, când enzima este saturată în întregime cu substrat. Acesta este egal cu constanta cinetică K_3. Viteza maximă arată numărul turnover al unei enzime, dacă concentraţia centrului activ [ET] este cunoscută, deoarece: Vmax. = K_3[ET]. De ex: o soluţie 10-6 M de anhidrază carbonică catalizează formarea a 0,6 M H_2CO_3 pe secundă atunci când este complet saturată cu substrat. Deci K_3 este $6 \times 10^{-2} s^{-1}$. Acest număr de turnover este unul dintre cele mai cunoscute. Fiecare ciclu al catalizei se produce într-un timp egal cu $1/K_3$, care este 1,7 microsecunde pentru anhidraza carbonică. Numărul de turnover al multor enzime cu substraturile lor fiziologice este în zona de $1\text{-}10^4$ pe secundă.

Enzimele alosterice nu ascultă de cinetica Michaelis-Menten. Atunci când se face proiecţia vitezei de reacţie V *versus* concentraţia de substrat S a unei enzime alosterice, nu se obţine o curbă hiperbolică în conformitate cu ecuaţia Michaelis-Menten (20), ci o proiecţie sigmoidală (figura 89).

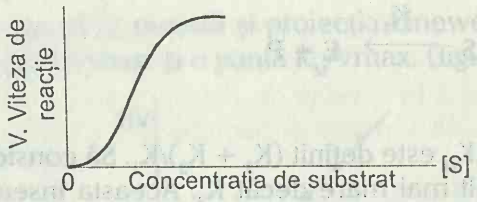


Fig. 89. Dependenţa sigmoidală a vitezei de reacţie versus concentraţia de substrat pentru o enzimă alosterică.

Astfel, curba legării oxigenului la mioglobină este hiperbolică, în timp ce curba hemoglobinei este sigmoidală. La enzimele alosterice, legarea substratului la un centru activ poate afecta proprietăţile altor centre active din aceeaşi moleculă de enzimă. Activitatea enzimelor alosterice poate fi alterată de moleculele reglatoare, care sunt legate la alte centre decât centrul catalitic (legarea oxigenului la hemoglobină este afectată de H^+ şi CO_2). Un număr de parametrii din mediul extern influenţează activitatea catalitică a enzimei; printre aceştia se numără temperatura, variaţiile de pH şi concentraţia de săruri. Aceste efecte nu sunt atât de importante în *vivo* în condiţii normale, dar sunt foarte importante în *vitro*, în efectuarea probelor pentru dozarea activităţii enzimei în plasma pacientului sau în probelede ţesut.

Inhibiţia enzimelor

Enzimele pot fi inhibate prin molecule specifice mici şi ioni, fapt ce serveşte ca un mecanism de control în sistemele biologice. De asemenea, multe medicamente şi agenţi toxici acţionează prin inhibarea enzimelor. Mai mult, inhibiţia poate fi o sursă de cunoaştere a mecanismului de acţiune a enzimei, reziduurile critice pentru cataliză pot fi adesea identificate folosind inhibitori speciali.

Inhibiţia enzimatică poate fi reversibilă sau ireversibilă. Inhibiţia reversibilă, în contrast cu cea ireversibilă, se caracterizează prin disocierea rapidă a complexului inhibitor-enzimă. Sunt posibile diferite tipuri de inhibiţie reversibilă şi ele pot fi deosebite cu uşurinţă prin analiza proiecţiei Lineweaver-Burk a activităţii enzimatice.

I. **Inhibiţia competitivă**

a) În inhibiţia competitivă reversibilă, inhibitorii competiţionează cu substratul, pentru a se lega de centrul activ (centrul catalitic) şi formează complexul enzimă-inhibitor [Ei] dar niciodată nu leagă ambele [ESi].

b) Pentru o inhibiţie competitivă, constanta de inhibiţie [Ki] este definită drept constanta de disociere pentru complexul enzimă-inhibitor [Ei].

c) Deoarece reacţia este reversibilă, complexul enzimă-inhibitor poate să revină la enzimă şi inhibitor liber.

Mulţi inhibitori competitivi seamănă cu substratul şi se leagă la centrul activ al enzimei, substratul fiind astfel împiedicat să lege acelaşi centru activ (figura 90).

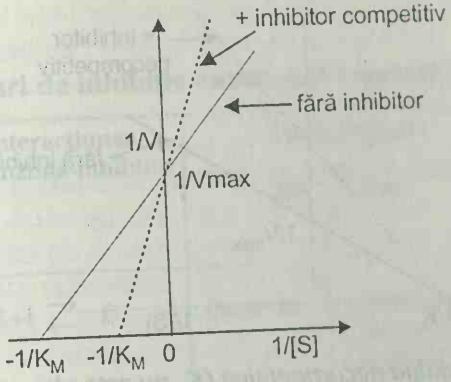


Fig. 90. Inhibiţia competitivă (Vmax nu este alterată).

O inhibiţie competitivă scade viteza catalizei prin reducerea proporţiei de molecule enzimatice legate de substrat. Un exemplu de inhibiţie competitivă este acţiunea malonatului asupra succinat dehidrogenazei, o enzimă care îndepărtează ionii de H de la succinat. Malonatul diferă de succinat prin faptul că are o singură grupare metil.

Un exemplu fiziologic important al inhibiţiei competitive este formarea 2,3-bifosfogliceratului (BPG) din 1,3 bifosfoglicerat. Bifosfoglicerat mutaza, enzima care catalizează această izomerizare, este inhibată competitiv de nivelul scăzut al 2,3-bifosfogliceratului. De fapt, este cunoscută inhibarea competitivă a unei enzime chiar de produsul propriu, deoarece acesta seamănă structural cu substratul.

II. **Inhibiţia necompetitivă**

a) Inhibitorii se leagă numai la complexul ES, la un *situs* distinct de *situs*-ul activ (ex: centrul alosteric).

b) Pentru un inhibitor necompetitiv, K este definită drept constanta de disociere pentru complexul ES – inhibitor. Deci în inhibiţia necompetitivă, inhibitorul şi substratul pot lega simultan o moleculă de enzimă, dar la *situs*-uri diferite. Un inhibitor necompetitiv acţionează prin scăderea turnover-ului enzimei, mai degrabă decât prin scăderea proporţiei de molecule de enzimă care sunt legate de substrat. Spre deosebire de inhibiţia competitivă, inhibiţia necompetitivă nu poate fi depăşită prin creşterea concentraţiei de substrat.

Inhibiţiile competitivă şi necompetitivă sunt deosebite din punct de vedere cinetic. La enzimele care se supun cineticii Michaelis-Menten, măsurarea ratei catalizei la diferite concentraţii ale substratului şi ale inhibitorului serveşte la deosebirea dintre inhibiţiile competitive şi cele necompetitive. În inhibiţiile competitive, intersecţia pantei 1/V *versus* 1/[S] este aceeaşi atât în prezenţa, cât şi în absenţa inhibitorului (figura 90), deşi panta este diferită. Aceasta reflectă faptul că Vmax., nu este alterată de o inhibiţie competitivă.

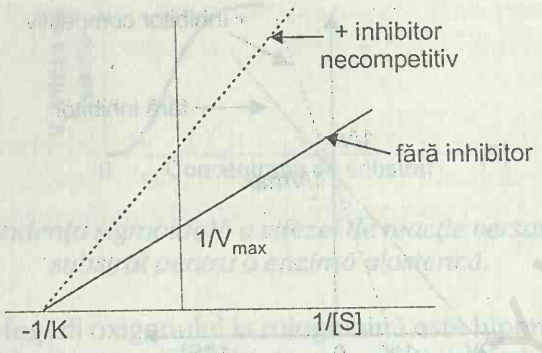


Fig. 91. Inhibiţia necompetitivă (K_M nu este alterat, Vmax scade).

Inhibiţia competitivă se caracterizează prin faptul că poate fi depăşită printr-o concentraţie suficient de mare de substrat. La o concentraţie de substrat suficient de mare, virtual toate centrele active sunt umplute cu substrat şi enzima este operativă în întregime.

În inhibiţia necompetitivă Vmax. este scăzut şi astfel intersecţia axei verticale este crescută. În contrast cu Vmax., K_M nu este afectat de legarea inhibitorului (figura 84, B).

III. **Inhibiţia non-competitivă**

Aceasta este un fel de inhibiţie mai complexă:

a) Inhibitorii se leagă atât la enzima liberă, cât şi la complexul ES la centrul alosteric, care este distinct de centrul activ.

b) Pentru un inhibitor non-competitiv „pur", constanta de disociere pentru legarea inhibitorului la enzimă şi la complexul ES este identică.

c) Pentru un inhibitor non-competitiv mixt, constanta de disociere pentru legarea inhibitorului la enzimă şi cea pentru legarea de complexul ES nu sunt egale (figura 92).

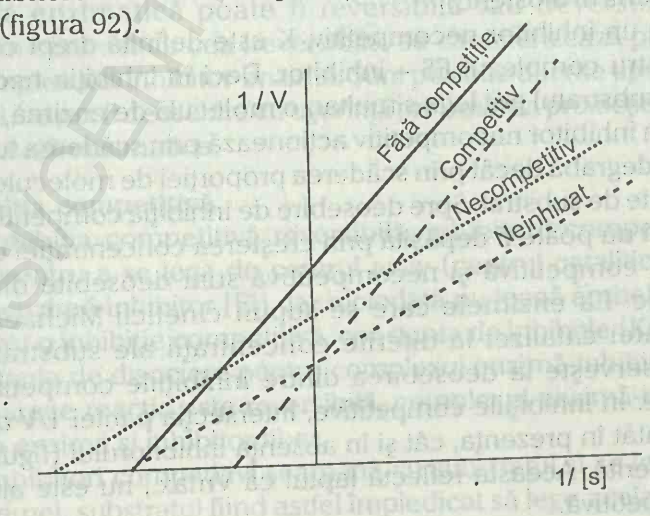


Fig. 92. Inhibiţia fără competiţie.

Tabelul 27

Tipuri de inhibiţie enzimatică reversibilă

Tipul de inhibiţie	Interacţiunea enzimă-inhibitor	Efectul asupra		
		Km	Vmax.	Proiecţia Lineweaver-Burk
I COMPETITIVĂ	$E+i \rightleftarrows Ei$	creşte	nu panta variază, intersecţia constantă	
II NECOMPETITIVĂ	$ES + i \rightleftarrows$	ESi	creşte descreşte constantă, intersecţia variază	panta
III FĂRĂ COMPETIŢIE	$E+i \rightleftarrows Ei$ $ES+i \rightleftarrows ESi$	nu	descreşte variază	panta variază, intersecţia

Inhibiţia competitivă ireversibilă. În acest tip de inhibiţie, substanţa inhibitoare se leagă covalent sau foarte strâns de centrul activ al enzimei, pe care o inactivează ireversibil. Modul de acţiune a inhibitorului ireversibil este variat:

a) Substanţe analoage cu substratul, care au grupe speciale cu reactivitate mare (care nu sunt prezente pe substraturile naturale), ce blochează centrul activ al enzimei, deoarece reacţionează covalent cu un reziduu aminoacid pe care îl modifică şi acesta nu mai poate lua parte la cataliză.

b) Alte categorii de substanţe analoage sunt transformate prin acţiunea catalitică a enzimei. Produsul acestei reacţii este foarte reactiv şi se combină covalent cu un reziduu aminoacid la centrul activ şi astfel inactivează enzima.

c) În sfârşit, sunt substanţe analoage a căror structură seamănă foarte mult cu starea de tranziţie a substratului natural. Analogii stării de tranziţie nu modifică covalent enzima, dar se leagă la centrul activ al enzimei atât se strâns, încât o inactivează ireversibil.

Multe substanţe toxice naturale şi compuşi sintetizaţi de om cu scop terapeutic sunt inhibitori ireversibili ai enzimelor. Este cunoscută acţiunea gazelor toxice asupra acetil-colinesterazei, o enzimă care joacă un rol important în transmiterea impulsului nervos. Diizopropilfosfofloridat (DIFF) unul dintre agenţi, reacţionează cu un reziduu de serină critic la centrul activ al enzimei, cu formarea unui complex inactiv. O altă substanţă inhibitoare, indometacidul, inhibă ireversibil activitatea catalitică a unor enzime, prin modificarea cisteinei în alt sediu al lanţului.

Aplicaţii terapeutice. Se descriu compuşi sintetici (unele medicamente implică sinteze de inhibitori ai unor enzime) şi compuşi naturali folosiţi ca medicamente care pot de asemenea inhiba ireversibil enzima printr-unul din aceste mecanisme. Un exemplu este *penicilina*, un analog al stării de tranziţie în reacţia catalizată de transpeptidază, o enzimă implicată în dezvoltarea membranei bacteriene, pe care o inhibă.

Penicilina a fost descoperită în anul 1928 de către Alexander Fleming, care a observat din întâmplare că într-o cultură de bacterii infectată cu o specie de mucegai (*Penicillium*) creşterea bacteriilor este inhibată. El a mai observat că un extract din acest mucegai inoculat la animale nu este toxic; cu toate acestea, datorită instabilităţii sale, purificarea şi studierea modului de acţiune nu a fost posibilă decât după 10 ani, când biochimistul Ernst Chain şi patologul Howard Flory au izolat penicilina şi au caracterizat-o.

Penicilina inhibă transpeptidazele bacteriene prin stratagema „calului troian". Transpeptidaza formează în mod normal un compus acil, intermediar cu penultimul reziduu D-alanina al D-Ala-D-Ala-peptid. Acest intermediar covalent acil-enzimă reacţionează cu grupul amino al glicinei terminale a peptidului pentru a forma o reţea. Penicilina pătrunde în centrul activ al transpeptidazei, deoarece mimează nucleul D-Ala-D-Ala al substratului normal şi formează legături covalente cu reziduul serină din centrul activ al enzimei. Acest complex enzimă-penicilină nu reacţionează mai departe, deoarece transpeptidaza este inhibată ireversibil. În anul 1957, Joshua Lederberg a arătat că bacteriile susceptibile la acţiunea penicilinei pot creşte în prezenţa ei, dacă se foloseşte un mediu hipertonic. Organismele obţinute astfel se numesc protoplaste şi sunt lipsite de peretele celular, de aceea se produce liza bacteriilor când acestea sunt transferate într-un mediu normal. Peretele celular constă din lanţuri de polizaharide, numite peptidoglicani, întretăiate de lanţuri peptidice scurte, care conferă membranei rezistenţă. Penicilina inhibă tocmai transpeptidaza, care catalizează sinteza peptidului ce asigură rezistenţa membranei.

Etanolul este folosit terapeutic ca un inhibitor competitiv pentru tratarea intoxicaţiei cu etilenglicol. Anual se produc multe decese datorită intoxicaţiei cu etilenglicol (un produs folosit ca antigel la automobile). Etilenglicolul în sine nu este o substanţă toxică letală. Trauma o produce acidul oxalic care rezultă din oxidarea etilenglicolului. Cristalele de acid oxalic se depun în rinichi şi îl lezează. Prima etapă a acestei conversii este oxidarea etilenglicolului la o aldehidă de către alcool dehidrogenaza. Această reacţie poate fi inhibată prin administrarea unei doze mari (la limita toxicităţii) de etanol. Raţiunea acestui tratament este aceea că etanolul este un substrat competitiv şi astfel blochează oxidarea etilenglicolului la aldehidă. Etilenglicolul este apoi excretat fără a produce leziuni.

Etanolul este folosit de asemenea ca substrat competitiv în intoxicaţiile cu metanol.

Aproape toate medicamentele folosite în terapie se bazează pe conceptul de inhibiţie enzimatică. Medicamentele sunt destinate să inhibe o anumită

cale metabolică. Această proprietate este mai mult apreciată la medicamentele antivirale, antibacteriene şi antitumorale care sunt administrate pacienţilor la limita toxicităţii. Această toxicitate adesea nu poate fi evitată, deoarece sunt puţine căi metabolice unice pentru tumori, virusuri sau bacterii (cu excepţia celei pentru sinteza peretelui celular al bacteriilor). Pe de altă parte, drogurile care vor omorî aceste organisme, vor distruge de asemenea şi celulele gazdă. O singură caracteristică poate fi socotită ca un avantaj: timpul relativ scurt al prezenţei organismelor nedorite în corp. Ele sunt atunci mult mai sensibile la antimetaboliţi şi în special ai acelora care inhibă enzimele implicate în replicare. Antimetaboliţii sunt compuşi cu unele modificări structurale faţă de substratul natural al enzimei pe care o inhibă.

Tabelul 28

Inhibitorii ireversibili ai enzimelor cu efect toxic şi aplicaţii terapeutice

Inhibitor	Enzima ţintă	Efect
Aspirina	Ciclooxigenază	Agent antiinflamator
Alopurinol	Xantenoxidaza	Drog în tratamentul gutei
5-Flavouracil	Timidilat sintetaza	Drog anticancer
Penicilina	Transpeptidaza	Drog antibacterium
Sarin	Colinesteraza	Agent chimic de luptă

Cunoaşterea modului de acţiune a enzimelor a dus la sintetizarea de anticorpi cu activitate catalitică, numiţi abzime. Conformaţia abzimei se bazează pe două principii. Primul principiu este uşurinţa sistemului imun de a recunoaşte aranjamentul atomilor în antigenul străin şi de a face un centru de legare pe imunoglobulina rezultată în urma legării acelui antigen. Al doilea principiu este acela că legarea strânsă de substraturile asemănătoare stării de tranziţie reduce bariera energetică de-a lungul căii de reacţie. În abzime, o stare de tranziţie analoagă serveşte ca haptenă. Anticorpii abzime măresc viteza de hidroliză a substratului de 10^{-3}-10^{-5} ori faţă de viteza obişnuită.

Izoenzimele

Multe enzime care catalizează reacţii chimice specifice sunt larg răspândite în celulele diferitelor specii şi chiar în organe diferite ale aceluiaşi organism. Deşi ele au activitate identică sau foarte asemănătoare, enzimele din surse diferite nu sunt proteine identice deoarece se deosebesc prin proprietăţi fizice, biochimice şi imunologice. Se crede, în general, că structura centrului activ este identică pentru o specificitate dată (sau cel puţin foarte asemănătoare), dar secvenţa de aminoacizi în multe secţiuni ale lanţului peptidic poate fi foarte diferită.

S-a stabilit că o enzimă obţinută din acelaşi organism poate exista în forme multiple, dacă serul sau extractele din ţesuturi diferite sunt studiate prin electroforeză sau pe medii diferite, specifice activităţii enzimei. Markert

şi Moller au propus că proteinele diferite prezente în acelaşi organism, cu activitate enzimatică similară, să fie numite *izozime*, deşi mulţi autori preferă termenul de *izoenzime*, recomandat de Uniunea Internaţională de Biochimie. Deşi izoenzimele lactat dehidrogenazei au fost cele mai studiate şi alte enzime de interes clinic se prezintă sub forme multiple. Între acestea sunt: fosfataza alcalină, amilaza, creatinkinaza, ceruloplasmina, glucoza 6-dehidrogenaza, aspartat transaminaza etc.

S-a convenit că toate enzimele au forme izoenzimatice. Izoenzimele diferă nu numai prin viteza de migrare electroforetică diferită, dar de asemenea au unele proprietăţi diferite ca: stabilitatea la denaturarea prin căldură, rezistenţa la diferiţi agenţi chimici inhibitori şi afinitatea pentru substraturi şi coenzime.

Proporţia de izoenzime variază în multe cazuri de la un ţesut la altul. Modelul migrării este diferit şi caracteristic ţesutului din care a fost recoltată proba. Distribuţia izoenzimelor LDH din extractul de hematii şi rinichi este similară cu cea din inimă, cu LDH_1 şi LDH_2 predominant, în timp ce nivelul izoenzimelor din muşchiul scheletic este asemănător celui din ficat, cu fracţiunea electroforetică lentă (LDH_5) mai abundentă. Cel de al treilea model se întâlneşte în multe ţesuturi inclusiv plămân, splină, tiroidă sau diferite forme de malignitate în care zonele intermediare sunt mai importante. Această distribuţie a izoenzimelor serice ne permite identificarea ţesutului lezat şi modelul izoenzimelor poate avea o valoare semnificativă în diagnosticul diferenţial.

Separarea unei izoenzime dintr-un amestec (ex: din ser) se poate face prin diverse metode: electroforeza zonală urmată de vizualizarea zonelor enzimatice separate prin procedee de colorare specifică este procedeul cel mai folosit în laboratoarele de biochimie. Mediul folosit ca suport pentru migrare este amidonul sau poliacrilamida, deoarece acestea dau zone ale izoenzimelor bine delimitate chiar dacă izoenzimele nu diferă prea mult din punct de vedere al greutăţii moleculare. Deoarece metoda electroforetică solicită timp şi echipament special, au fost puse la punct alte metode care se bazează pe proprietăţi fizice: diferenţe de eluţie de pe schimbători de ioni sau stabilitatea la căldură. De ex: stabilitatea mare la căldură a izoenzimei LDH_1 în comparaţie cu LDH_5 stau la baza unui test foarte folositor, în care este măsurat procentul din enzima totală care rezistă o perioadă fixă de încălzire la 60°C. Alte metode se bazează pe specificitatea relativă a izoenzimelor faţă de substrat care poate fi folosită pentru diferenţierea lor. De ex: izoenzima LDH_1 este relativ mai activă cu substratul alfa-hidroxibutirat decât LDH_5. Alte metode se bazează pe diferenţele de răspuns a izoenzimelor la inhibitori. Acest mod de investigare a fost folosit pentru a detecta şi estima izoenzima intestinală a fosfatazei alcaline din fosfataza alcalină totală din ser, deoarece această izoenzimă este inhibată semnificativ mai mult de L-fenilalanină decât sunt inhibate izoenzimele din ţesutul osos sau ficat. Uneori diferenţele structurale dintre izoenzime sunt atât de mari încât au antigenicitate distinctă. Antiserurile pure faţă de izoenzime diferite pot fi

induse prin injectarea materialului purificat într-un animal (ex. iepure). Aceste antiseruri pot fi apoi folosite pentru analizarea unei mixturi de izoenzime, deoarece fiecare antiser va reacţiona în condiţii potrivite numai cu izoenzima specială faţă de care a fost preparat antiserul şi o va inactiva sau precipita.

Izoenzima LDH1 diferă suficient de mult de LDH_5 pentru a putea fi deosebită de aceasta. De asemenea, fosfataza alcalină placentară este suficient de diferită de alte izoenzime ale fosfatazei, fapt ce permite prepararea de antiseruri specifice faţă de aceste forme izoenzimatice.

Structura izoenzimelor LDH. Este bine stabilit că lactat dehidrogenaza este o proteină compusă din patru subunităţi (este un tetramer). Dacă fracţiunea corespunzătoare muşchiului inimii (cea mai rapidă electroforetic, LDH_1) este tratată cu uree 8M pentru a se disocia în monomeri, se constată că toate unităţile sunt identice. De asemenea, cea mai lentă bandă (LDH_5) corespunzătoare ţesutului hepatic este formată din monomeri identici, dar deosebiţi de cei din ţesutul inimii. În celelalte fracţiuni, proporţia de unităţi H specifice inimii (*heart*) creşte o dată cu creşterea mobilităţii electroforetice a izoenzimei. Cele cinci izoenzime ale lactat dehidrogenazei sunt compuse astfel: LDH_1 (banda de migrare cea mai rapidă) este compusă din patru monomeri H şi poate fi notată HHHH (sau H_4). Următoarea bandă LDH_2 este HHHM (sau H_3M). Alte izoenzime sunt descrise similar, LDH_3 este H_2M_2, LDH_4 este HMMM (HM_3), iar cea mai lentă bandă corespunzătoare izoenzimei din ficat este LDH_5 – MMMM (M_4). Notaţia M pentru izoenzima din ficat vine de la faptul că LDH_5 se găseşte în cantitate mare şi în muşchiul scheletic. Sinteza monomerilor H şi M este sub control genetic, aşa încât ţesutul în care gena H este mai activă va avea un conţinut mai mare din izoenzima în care predomină monomerul H. Degradarea izoenzimelor contribuie de asemenea la deosebirile dintre ele. De ex: timpul de înjumătăţire al izoenzimei LDH_5 (M_4) este de 10 ori mai lung decât al izoenzimei LDH_1 (H_4).

Importanţa enzimelor pentru practica medicală

Folosirea investigării enzimelor ca ajutor în diagnosticul clinic a început foarte timpuriu, la începutul secolului nostru, cu determinarea amilazei, urmată de fosfataza alcalină şi acidă, colinesterază şi enzimele implicate în coagularea sângelui. Mai târziu au fost puse la punct metode pentru determinarea în ser a multor enzime intracelulare; în special transaminazele au deschis un câmp nou pentru stabilirea diagnosticului. Enzimele pot fi detectate în plasmă şi determinate cantitativ pe baza activităţii lor. Cu toate acestea, cunoaşterea distribuirii enzimelor în organe, ţesuturi şi în structura celulei, ca şi comportamentul lor în ser, sunt importante pentru aplicarea în practică a determinării enzimelor: pentru a trage concluzii asupra întinderii şi severităţii leziunii, asupra fazei acute şi a progresului bolii şi asupra implicării mai multor organe în maladia respectivă.

În serul sau plasma normală poate fi identificat un mare număr de enzime, cu o varietate de surse.

Mai mult decât o clasificare bazată pe funcţiile chimice (ex: carbohidraze, esteraze, dehidrogenaze etc.) sau o clasificare bazată pe rolul lor fiziologic în metabolism (ex: enzime implicate în glicoliză, în ciclul acidului citric sau în lanţul respirator etc.) ar fi mai utilă pentru clinică o clasificare care să depindă de locul lor de acţiune. Atunci, potrivit localizării funcţiei, enzimele pot fi împărţite în două grupe mari: enzime *secretate (extracelulare)* şi enzime *intracelulare*. Enzimele secretate îşi îndeplinesc funcţiile numai în afara celulei în care sunt produse (ele trebuie să fie secretate pentru a ajunge la locul lor de acţiune), iar enzimele intracelulare sunt eficiente numai legate de procesele metabolice intracelulare în afara celulei sunt inactive (tabelul 29).

Tabelul 29

Enzimele	**Efectul în ser a leziunii celulare de origine**
Enzime secretate	
Tipul (a) PLASMĂ Enzimele din procesul de coagulare a sângelui – pseudocolinesteraza	scade
Tipul (b) TRACTUSUL DIGESTIV – amilaza, lipaza	cresc
Enzime intracelulare	
Transaminazele, CPK, GLDL, LDH etc.	cresc

Pentru fiecare dintre cele două grupe de enzime, celulele de origine au de îndeplinit sarcini noi, după ce enzima a fost sintetizată.

Enzimele extracelulare trebuiesc transportate la locul de acţiune, în timp ce enzimele intracelulare trebuiesc împiedicate să iasă prin membrana celulară; lezarea celulelor ar duce la perturbarea funcţiei enzimelor. De ex: lezarea ficatului duce la limitarea sintezei şi secretării enzimelor care controlează coagularea sângelui şi astfel concentraţia acestor enzime este scăzută în ser. Pe de altă parte, alterarea permeabilităţii membranei face ca enzimele intracelulare, cum sunt transaminazele, să părăsească celulele hepatice şi, în consecinţă, concentraţia enzimelor în plasmă să fie crescută.

Conectarea enzimelor la sistemul endocrin face ca enzimele să ocupe o poziţie intermediară: creşterea permeabilităţii membranei celulei în care s-a sintetizat enzima predomină în faza acută a bolii, fază în care cantitatea de enzimă din plasmă creşte, dar restricţia sintezei şi reducerea activităţii enzimei se observă în fazele cronice ale bolii.

Fiecare organ are „modelul enzimatic" propriu. Prin aceasta, el poate fi recunoscut şi diferenţiat de alte organe. Diferenţele dintre activităţile enzimatice ale organelor sunt uneori atât de mari, încât o activitate mare se poate produce numai într-un singur organ, în timp ce în alte organe aceasta să fie foarte mică. Astfel de exemple sunt SDH (sorbitol dehidrogenaza) şi fructoza 1-fosfat aldolaza care se produc numai în ficat, CPK a cărei activitate esenţială este numai în muşchiul striat. Acestea sunt enzime organ specifice.

Procentajul enzimelor distribuite sub formă de izoenzime în diferite organe variază adesea de la organ la organ şi atunci ne furnizează date diferite. Cel mai bun exemplu este lactat dehidrogenaza LDH a cărei concentraţie diferă considerabil în diferite organe.

O diferenţă marcantă este între muşchiul inimii şi ficat (figura 93).

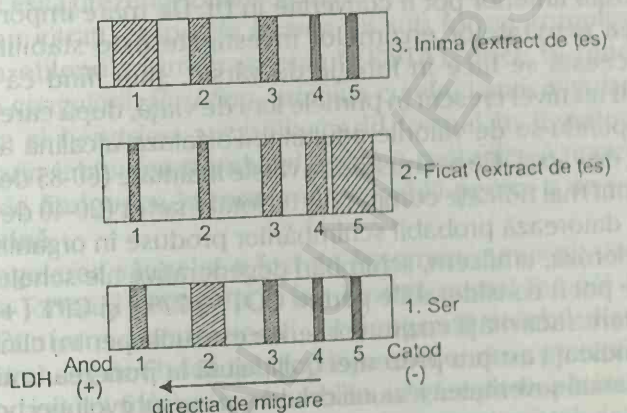


Fig. 93. Separarea izoenzimelor LDH pe acetat de celuloză.

Cu toate acestea, diferenţa dintre organe în ceea ce priveşte activitatea unei enzime nu este limitată; diferite structuri ale celulei se pot deosebi din punct de vedere al compoziţiei enzimatice. De ex: GLDH se găseşte în mitocondrie, în timp ce LDH şi GPT sunt prezente numai în citoplasmă. GOT, malat dehidrogenaza şi izocitrat dehidrogenaza se produc în ambele fracţiuni celulare (mitocondrie şi citoplasmă). Aceste enzime biloculare sunt izoenzime: au mobilitate electroforetică diferită şi alte modificări şi pot fi identificate prin măsurarea separată a activităţii fiecărei izoenzime.

Spre deosebire de plante, celulele animalelor nu sunt separate unele de altele prin membrane rigide; de aceea are loc o schimbare rapidă a materialului biologic prin interfeţele lor şi este necesară o energie constantă pentru a menţine această diferenţă de concentraţie. Astfel, chiar după o lezare uşoară a celulei, enzimele intracelulare scapă în fluidul extracelular şi plasmă.

Gradul de creştere a enzimelor din plasmă este determinat de extinderea şi severitatea leziunii. Cu cât este mai mare leziunea (un număr mai mare de celule este lezat) şi procesul distructiv este mai acut, cu atât mai crescută va fi valoarea enzimei investigate în plasmă.

Deoarece modelele enzimatice şi distribuţia izoenzimelor diferă în organe şi ţesuturi, nu putem asocia creşterea unei enzime în ser cu leziunea organului care a produs-o. Acest lucru este posibil numai în cazul unei enzime organ specifice cum este creşterea activităţii SDH în hepatita acută, când este lezat un număr mare de celule, sau cu ajutorul enzimei organ specifice CPK sau izoenzimele LDH. Cu toate acestea, cu ajutorul unei baterii de enzime bine selectate, care caracterizează un organ (ficat, inimă, prostată) şi ţinând seama de stadiul bolii, se poate face un diagnostic diferenţial.

Activitatea enzimei este exprimată în Unităţi Internaţionale (UI) conform recomandării Comisiei de Enzime a Uniunii Internaţionale de Biochimie (IUB). 1 UI este activitatea enzimei care în condiţii optime converteşte 1 micromol substrat pe minut. UI se referă la 1 litru de ser sau plasmă. Atunci rezultatele analizelor enzimatice sunt exprimate în U/l sau mU/ml. Multe din unităţile folosite anterior pot fi convertite în UI. De mare importanţă pentru interpretarea rezultatelor enzimelor investigate este stabilirea valorilor normale. Aceasta se face în funcţie de vârstă, ştiut fiind că majoritatea enzimelor au un nivel crescut în primele luni de viaţă, după care valoarea lor scade, apropiindu-se de valorile adultului. Fosfataza alcalină arată o mare dependenţă de vârstă. De asemenea, la vârste înaintate (60-85 de ani) valorile enzimelor sunt mai ridicate comparativ cu lotul martor (20-40 de ani). Aceste diferenţe se datorează probabil schimbărilor produse în organism cu vârsta ca: arterioscleroza, emfizem, schimbări degenerative ale scheletului, varice etc. Variaţiile pot fi considerabile pentru GOT (+77%) şi GPT (+31%).

Cunoaşterea activităţii enzimelor serice este utilă pentru clinician pentru că ele dau indicaţii asupra prezenţei bolii, ajută la punerea unui diagnostic diferenţial şi arată severitatea leziunii celulare şi cursul evoluţiei bolii. În puţine cazuri, numai determinarea activităţii enzimelor este suficientă pentru punerea diagnosticului, dar fără a le limita importanţa, ele trebuiesc interpretate în context clinic.

Prezentăm în continuare prescurtările celor mai importante enzime, precum şi E.C.-ul (numărul de cod):

Prescurtările curente ale denumirii enzimelor	Denumirea obişnuită	E.C.
ALD	fructoza 1,6-difosfat aldolaza	4.1.2.13
AP	fosfataza alcalină	3.1.3.1
CHE	colinesteraza	3.1.1.8
CK sau CPK	creatinkinaza	2.7.3.2
gamma GT	gamma glutamil transferaza	2.3.2.2
GGTP	sau gamma glutamil transpeptidaza	2.3.2.2
GLDH	glutamat dehidrogenaza	1.4.1.3
AST sau GOT	aspartat aminotransferaza	2.6.1.1
ALT sau GPT	alanin aminotransferaza	2.6.1.2
LDH	lactat dehidrogenaza	1.1.1.27
LAP	leucin arilamidaza	3.4.1.1
SDH	sorbitol dehidrogenaza sau L-iditol dehidrogenaza	1.1.1.14
ACP	acid fosfataza	3.1.3.2.

5.4.8. Hemostaza și coagularea

Hemostaza şi coagularea sunt mecanisme complexe de apărare ale organismului împotriva hemoragiilor. Sângele circulant îşi păstrează fluiditatea numai în cazul contactului cu suprafaţa netedă a endoteliului, sau cu alte suprafeţe artificiale netede, ca vase parafinate sau siliconate. În contact cu suprafeţe rugoase, încărcate electronegativ, sângele se coagulează prin transformarea fibrinogenului solubil din plasmă într-un cheag de fibrină solid şi insolubil. Importanţa fundamentală a prezenţei fibrinogenului pentru manifestarea coagulării reiese din faptul că sângele din care a fost îndepărtat fibrinogenul prin *defibrinare* sau *lizã enzimatică* nu se coagulează. Formarea cheagului necesită prezenţa ionilor de *calciu*. Ca urmare, precipitarea calciului cu oxalaţi sau citraţi, respectiv fixarea lui sub forma complexă de către *chelatori*, ca etilendiamintetraacetatul (EDTA), duce în mod similar la suspendarea coagulării. *Hirudina*, proteina cu efect anticoagulant din saliva lipitorilor, ca şi *heparina*, un polizaharid format în hepatocite, inhibă coagularea prin inhibarea *trombinei*, enzima proteolitică, care transformă moleculele de fibrinogen în monomeri capabili pentru a se polimeriza în cheag de fibrină.

Deşi coagularea sângelui a fost un fenomen cunoscut demult, teoria enzimatică a formării cheagului a fost lansată numai în anul 1905 de Jan Morawitz. Conform acestei teorii, fibrinogenul solubil din plasmă se transformă în cheag de fibrină sub acţiunea unei enzime proteolitice, numită *trombină*. În condiţii fiziologice, trombina se găseşte în plasmă sub forma inactivă a protrombinei, care se activează în prezenţa ionilor de Ca++, de către o altă enzimă proteolitică, numită *trombokinaza*, eliberată din trombocitele (plachetele sanguine) „distruse" la nivelul leziunii vasculare. Deşi reacţia de activare proteolitică a protrombinei nu se manifestă prin fosforilare (deci enzima activatoare nu poate fi numită kinază, mai degrabă *tromboplastină*), în ciuda numeroaselor descoperiri ulterioare, teoria enzimatică a coagulării, în esenţă, şi-a păstrat valabilitatea. Schema lui Morawitz, privind mecanismul enzimatic al coagulării sanguine, este prezentată în figura 94.

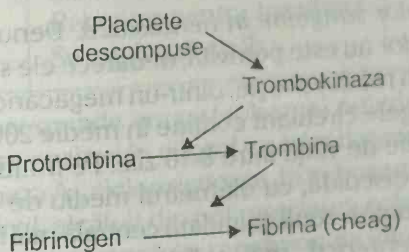


Fig. 94. Schema coagulării sanguine după Morawitz.

În urma cercetărilor substanţiale efectuate în *vitro* şi în *vivo* în cursul deceniilor la numeroşi bolnavi cu diateze hemoragice diferite, ereditare şi dobândite, s-au adunat cunoştinţe vaste referitoare nu numai la factorii de coagulare din plasmă, dar şi la elementele figurate circulante ale sângelui, precum şi la structura şi funcţiile vaselor. Astfel în momentul de faţă, noţiunea largă a *hemostazei* cuprinde toţi factorii de origine *vasculară, tisulară, celulară* şi *plasmatică* ai acestui sistem deosebit de complicat, funcţionând ca un tot unitar. Totuşi, din motive mai mult didactice, hemostaza se împarte în două faze mari deosebite: *faza vasculoplachetară* şi faza *plasmatică*, adică formarea cheagului de fibrină, inclusiv *fibrinoliza*. Astfel, termenul de *coagulare sanguină*, folosit anterior pentru desemnarea întregului mecanism de apărare împotriva hemoragiilor, este acum limitat la *faza plasmatică a hemostazei*.

A. **Faza vasculoplachetară**

a) *Rolul vaselor în hemostază*. Patul vascular, în primul rând vasele mici şi capilarele, joacă roluri multiple şi în hemostază. Endoteliul vascular, prin suprafaţa lui netedă şi extinsă de contact cu sângele circulant, asigură frecarea minimă a ţesutului lichid, precum şi prevenirea activării prin contact a factorilor de coagulare generatoare de tromboplastină. Tot celulele endoteliale produc *trombomodulina*, o glicoproteină cu masa moleculară de 74 000 d, având un efect stimulator asupra activităţii fibrinogenolitice a trombinei. Celulele endoteliale preiau din sânge tromboxanele de origine plachetară cu o activitate agregantă marcantă şi le transformă enzimatic în prostacicline, inhibitori puternici ai agregării plachetelor sanguine.

Prin reactivitatea lor faţă de mediatorii vasoreglatori (catecolaminele, histamina, serotonina), vasele mici sunt în stare să reducă printr-o vasoconstricţie fluxul sângelui spre regiunea vasculară lezată. Tunica medie a arteriolelor conţine elemente musculare netede, sensibile faţă de o proteină secretată de plachetele sanguine, numită *factor de creştere derivat din plachete* (*Platelet Derived Growth Factor, PDGF*), care induce proliferarea lor. Tot în acest strat vascular se formează şi se eliberează o altă proteină enzimatică, numită *activatorul tisular al plasminogenului* (*Tissue Plasminogen Activator, TPA*), care declanşează fibrinoliza prin activarea proteolitică a plasminogenului din plasmă.

b) *Rolul plachetelor sanguine în hemostază*. Denumirea anterioară de *trombocite a plachetelor* nu este potrivită, deoarece ele sunt lipsite de nucleu. În cursul formării lor în măduva roşie, dintr-un megacariocit se desprind circa 2-3 000 plachete. Sângele circulant conţine în medie 200 000 de plachete/μl, care au o durată medie de viaţă între 8-10 zile. Pe frotiul periferic colorat se prezintă sub o formă discoidă, cu diametrul mediu de 1 x 1,4 μm. În frotiul colorat plachetele prezintă o zonă granulară centrală mai bine colorată, numită *granulomer* şi una *periferică*, mai palidă, numită *hialomer*. Cu ajutorul microscopului electronic de reliefare (*scanning*) se pot identifica numeroase protuberanţe de membrană ale suprafeţei externe a plachetelor, prezentând

şi numeroşi pori prin membrană. Membrana plachetelor este de obicei înconjurată de un strat glucidic polimerizat (atmosferă periplachetară) mai mult sau mai puţin gros, numit *glicocalix*. Structura plachetelor este prezentată schematic în figura 95.

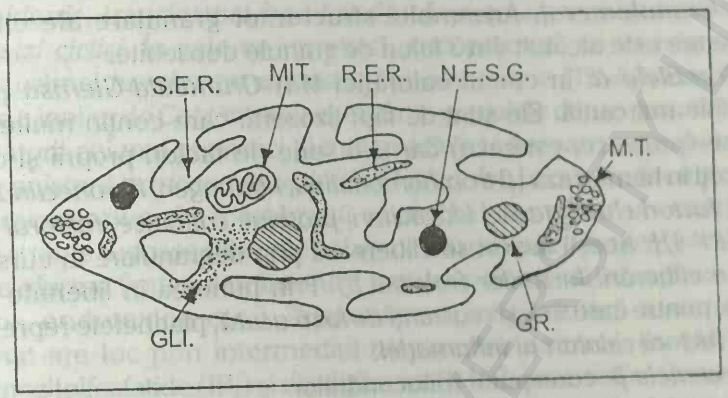


Fig. 95. Structura plachetelor sanguine (explicaţia în text).

– *Membrana plachetară corespunde structurii membranelor celulare lipidice bistratificate, conţinând mai multe feluri de* glicozaminoglicane, dintre care unele mai importante sunt prezentate în tabelul 30.

Tabelul 30

Glicozaminoglicanele membranei plachetare

Glicoproteina	Rolul funcţional	Lipsa
GP Ia (s) de suprafaţă	Aderenţa plachetelor	agregare slabă
GP Ib	Receptor pentru factorul von Willebrand şi trombină	Bernard-Soulier
GP IIb	Receptor pentru fibrinogen şi factorul vW	Glanzmann (trombastenie)
GP IIIa	Similar cu IIb	
GP V	Receptor pentru trombină	
GP IX	Se cuplează cu Ib	Bernard-Soulier

– *Hialomerul* corespunde eragastoplasmei netede (lipsită de ribozomi) şi conţine numeroase enzime în citozol ca adenilat-ciclaza, ATP-aza Na^+/K^+-dependentă, fosfolipaza A_2, ciclooxigenaza, tromboxan-sintetaza etc. *Sistemul microtubular contractil*, alcătuit din polimerizarea coloanelor de *tubulină*, se situează ecuatorial. La semnalele recepţionate din exterior (contact cu suprafeţe rugoase, catecolamine, ADP, tromboxane, trombină) sistemul microtubular reacţionează prin contracţie, prin care *forma discoidă* a plachetelor

devine sferică. Apoi se formează prelungiri multiple, sub forma pseudopodelor, prin care plachetele învecinate se fixează între ele. Ansamblul acestor transformări succesive se numeşte *metamorfoza vâscoasă* a plachetelor, deoarece în urma manifestării ei, vâscozitatea suspensiei lichide a plachetelor creşte considerabil.

– *Granulomerul.* Ansamblul structurilor granulare ale citoplasmei plachetare este alcătuit din 3 feluri de granule deosebite:

Granulele α: în cursul coloraţiei *May-Grünwald-Giemsa* prezintă o azurofilie marcantă. Ele sunt de fapt lizozomi care conţin multe şi variate enzime (proteaze, esteraze) dar şi o serie de factori proprii şi depozitaţi, implicaţi în hemostază [*β-trombomodulina, fibrinogen, fibronectina, adezine, PDGF, factori chemotactici leucocitari, proteine cationice, factorul plachetar nr. 4 (PF-4)]*. Aceşti factori se eliberează prin degranulare în cursul *fazei a doua a eliberării factorilor (release II)*. Prin punerea în libertate a acestor factori, printre care unii şi *reactanţi de fază acută*, plachetele reprezintă unul dintre *factorii celulari ai inflamaţiei*.

Granulele β: corespund mitocondriilor.

Granulele dense: au fost denumite pe baza densităţii lor electronooptice, cauzate de conţinutul lor mare în ioni de Ca^{++}, fixaţi în interiorul granulelor sub formă legată de *calsechestrină*. Pe lângă Ca^{++}, granulele mai conţin şi ATP, ADP şi serotonină. Conţinutul granulelor este pus în libertate prin degranulare în cursul fazei întâia a eliberării factorilor (*release I*). Deşi din citoplasma plachetelor lipsesc structurile aparatului lui Golgi, eliberarea prin degranulare a factorilor depozitaţi are loc foarte repede.

– *Factorii trombocitari ai hemostazei.* Factori proprii sau plasmatici depozitaţi în plachete şi puşi în libertate în cursul fazelor de eliberare se numesc *factori plachetari* (PF) şi se numerotează cu cifre arabe de la 1 până la 6.

PF1: corespunde proaccelerinei (FV) din plasmă, depozitată temporar şi reeliberată de plachete.

PF2: *β-trombomodulina* reprezintă proteina fixatoare de trombină a endoteliului vascular. Trombina fixată de β-trombomodulină îşi pierde activitatea procoagulantă privind activarea plachetelor, a factorilor plasmatici FV şi FVIII, precum şi transformarea fibrinogenului în fibrină.

PF3: *fosfatidilserina* şi *fosfatidilinozitolul* din membrana plachetelor, factorul fosfolipidic necesar formării *tromboplastinei plasmatice*.

PF4: antiheparina plachetară (proteina bazică).

PF5: *serotonina* (5-HO-triptamina).

PF6: retractoenzima.

Desfăşurarea în timp şi mecanismul activării plachetelor. Activarea plachetelor este declanşată prin excitarea receptorilor de membrană, fie printr-un *mecanism intrinsec* (intraplachetar), fie printr-un *mecanism extrinsec* (declanşat din exterior). Ambele mecanisme duc la manifestarea în două faze a *metamorfozei vâscoase* a plachetelor şi a eliberării factorilor plachetari (*release*), din care faza I este *reversibilă*, adică se stinge în caz de lipsă de

amplificare, iar cea de-a II-a este *ireversibilă*, adică o dată declanşată nu mai poate fi oprită.

– *Mecanismul intrinsec al activării plachetelor.* Enzima *fosfolipaza-A* activată, eliberează prin hidroliză din unele fosfolipide ale membranei plachetelor un acid gras cu catenă lungă (cu 20 de atomi de carbon), numit *acid arahidonic*, transformat imediat de către enzima *ciclooxigenaza* în *endoperoxizi ciclici*. În cele ce urmează, endoperoxizii se transformă sub acţiunea enzimei *tromboxan-sintetaza* în tromboxane (TX-A_2). Prin brusca mobilizare a ionilor de Ca^{++} intraplachetari din granulele dense, tromboxanele sunt activatorii cei mai puternici ai metamorfozei vâscoase a plachetelor.

– *Mecanismul extrinsec al activării plachetelor* porneşte din momentul activării receptorilor de membrană ai plachetelor printr-un contact cu suprafeţe străine rugoase (fibre de colagen) sau cu unii *mesageri (mediatori) ai fazei de alarmă* (catecolamine, ADP, proteaze, trombină, complexe imune circulante, endotoxine etc.). Transmiterea intracelulară a semnalului recepţionat are loc prin intermediul *mesagerilor secunzi*, ca AMP ciclic (AMPc), inozitolfosfatide (IP_3) şi diacilglicerol (DAG), ionii de Ca^{++}, monoxidul de azot (NO), prin intermediul diferitelor *proteinkinaze*.

În cursul *primei faze* a activării plachetare (*release I*) se eliberează conţinutul granulelor dense. Procesul este reversibil în sensul că în lipsa unei amplificări poate să se stingă. *Faza a doua* a activării este caracterizată prin golirea conţinutului de Ca^{++} al granulelor. În prezenţa *adezinelor* (fibronectina, fibrinogen), plachetele prezentând metamorfoza vâscoasă aderă între ele şi formează cheagul alb, care înseamnă dopul primitiv al leziunii microvasculare. Serotonina eliberată din plachetele agregate, prin efectele sale vasoconstrictoare, reduce fluxul sanguin spre zona lezată.

Tulburările fazei vasculoplachetare pot fi ereditare sau dobândite.

Tulburări ereditare. O parte a diatezelor hemoragice sunt cauzate de tulburările fazei vasculoplachetare a hemostazei. *Formele ereditare* ale acestor tulburări sunt caracterizate mai mult prin defecţiuni funcţionale (trombopatii) şi mai puţin prin scăderi numerice ale plachetelor. Tulburările ereditare ale funcţiilor plachetare pot prezenta *defecţiuni ale adeziunii*, ale *eliberării factorilor* şi ale *agregării*.

a. La bolnavii cu *adeziunea deficitară* a plachetelor lipsesc glicoproteinele GPIs şi GPIb din membrană (*boala Bernard-Soulier, sindromul plachetelor gigante*). Boala se transmite recesiv autozomal, plachetele gigante nu se agregă în prezenţa factorului von Willebrand (F-vW) şi a ristocetinei, ci a ADP, TX-A_2 şi a trombinei. În lipsa factorului VIII (F-VIII/von Willebrand) din plasmă (angiohemofilia von Willebrand), plachetele nu se agregă în prezenţa *ristocetinei*. Se deosebesc astfel 3 forme clinice: *forma angiopatică* ce se manifestă la femei ca o dismenoree gravă; *forma angiotrombopatică* care este caracterizată prin alungirea marcantă a timpului de sângerare-coagulare (TSC) şi *forma angiohemofilică* la bărbaţi. Boala se transmite legat de sex şi în acelaşi timp şi autozomal dominant, deoarece cei doi produşi genetici ($FVIIIvW$ şi $FVIIIcoag$) sunt codificaţi de două perechi de alele separate.

Perechea de alele care controlează biosinteza F-vW sunt situate în cromozomul (sau cromozomii) X, iar cea a factorului F-VIII$_{coag}$, într-o pereche autozomală de cromozomi.

b. *Tulburările eliberării factorilor plachetari* sunt caracterizate prin scăderea numerică a granulelor dense, cu scăderea marcantă sau lipsa calciului intraplachetar. Această afecţiune numită *boala rezervorului depozitat* (*storage pool disease*) şi transmisă autozomal recesiv este caracterizată prin lipsa aproape totală a capacităţii plachetelor de a elibera factorii depozitaţi, din cauza lipsei sau scăderii ereditare în hialomerul plachetelor a enzimei ciclooxigenază. Un sindrom similar poate să se manifeste şi la bolnavii sub tratament cu aspirină sau alt antiinflamator nesteroidic.

c. *Tulburările agregării plachetelor* la bolnavii cu *trombastenia ereditară Glanzmann,* numărul plachetelor este în limitele normale, dar din cauza lipsei glicoproteinelor de membrană (receptorii fibrinogenului) GP IIb/IIIa, TSC devine alungit, cheagul format din sângele bolnavului nu se retrage. Cu excepţia prezenţei FVIIIvW, plachetele nu agregă în prezenţa altor factori agreganţi ca ADP, colagen, trombina, adrenalina. Un sindrom similar se manifestă şi la bolnavii cu *lipsă congenitală a fibrinogenului (afibrinogenemie)*, dar şi în cursul unui sindrom grav de *hiperfibrino(geno)liză secundară*, inflamatoare.

Tulburări dobândite. Tulburările secundare, dobândite, ale plachetelor pot fi cauzate atât de dereglările formării, cât şi ale consumării lor. În cazul scăderii numărului plachetelor sub 150 000/μl, deşi bolnavii sunt încă asimptomatici, este vorba de o *trombocitopenie*. Simptomele clinice (diateza hemoragică, alungirea TSC, peteşii, sufuziuni, echimoze) apar la valori de sub 80 000/μl. Starea bolnavilor devine critică din cauza hemoragiilor mucoase spontane la valori de sub 20 000/μl. În schimb, trombocitozele cu creşterea numărului plachetelor peste valori de 300 000/μl duc de obicei la o predispoziţie la tromboză, rareori însă şi la o diateză hemoragică, de ex. în cazul unei *trombocitemii esenţiale*.

B. Faza plasmatică a hemostazei: coagularea sanguină

Sângele recoltat într-o eprubetă cu pereţii rugoşi coagulează în 5-6 minute, această perioadă de timp reprezentând *timpul de coagulare venoasă*. În schimb, în cazul recoltării într-o eprubetă parafinată sau siliconată sângele rămâne fluid pentru un timp îndelungat. Ca urmare, pentru formarea sau activarea *tromboplastinei plasmatice* este necesară realizarea unui *contact direct* cu suprafeţe străine, încărcate electronegativ. *Mecanismul intrinsec* al formării tromboplastinei plasmatice cuprinde deci activarea *factorilor de contact* ai coagulării, care se manifestă în 5-6 minute.

În prezenţa unor fosfolipide de origine tisulară (extractibile de ex. din substanţa cenuşie a creierului), prin intrarea în funcţiune a *mecanismului extrinsec* al coagulării, cheagul de fibrină se formează în câteva secunde. *Indiferent* de natura mecanismului declanşat se formează însă, aceeaşi tromboplastină plasmatică, care transformă protrombina inactivă în trombină

funcţională, transformatoare a fibrinogenului în fibrină. Faza plasmatică a hemostazei, adică coagularea propriu-zisă a sângelui, constă în transformarea fibrinogenului solubil în cheag de fibrină insolubilă. Pentru această transformare este necesară activarea succesivă a numeroşilor *factori de coagulare*, a căror activitate este modulată şi reglată de diferiţi cofactori, precum şi de alţi anticoagulanţi endogeni. În urma descoperirii acestor mecanisme, teoria anterioară a *cascadei de coagulare plasmatică* şi-a pierdut valabilitatea.

Deşi mecanismul complex al hemostazei, inclusiv coagularea sângelui, funcţionează în organism ca un tot unitar, din punct de vedere sistemic, cea din urmă se împarte în 5 faze succesive: *prefaza*: formarea tromboplastinei plasmatice, fie prin mecanismul intrinsec, fie prin cel extrinsec, tisular; *faza I*: transformarea protrombinei în trombină activă; *faza a II-a*: coagularea propriu-zisă, transformarea fibrinogenului solubil în cheagul de fibrină insolubilă; *faza a III-a*: fibrinoliza (uneori şi fibrinogenoliza); *faza a IV-a*: *retracţia* cheagului.

a. **Prefaza coagulării plasmatice**

Formarea tromboplastinei plasmatice în cadrul mecanismului extrinsec are loc în câteva secunde (10"-15"), iar în cadrul celui intrinsec în 6-8 minute. Alături de fosfolipidele de origine tisulară, respectiv plachetară (PF-3), pentru manifestarea ambelor mecanisme este necesară prezenţa unor factori plasmatici de coagulare comuni, ca F-IV (Ca^{++}), F-X (*Stuart-Prower*) şi cofactorul F-V, VI (*proaccelerina, accelerina*). Diferenţa de timp între cele două mecanisme se explică prin faptul că în afara factorilor comuni, mecanismul extrinsec necesită numai prezenţa unui singur factor de coagulare propriu (F-VII, *convertina*); în schimb, în cadrul mecanismului intrinsec funcţionează 3 factori (F-XII, *Hageman*; F-XI *Roseman*; F-IX, *Christmas*, dar în urma recunoaşterii oficiale a factorilor de contact: Williams, Fleaujeac şi Fletcher va creşte la 6) şi un cofactor (F-VIII, globulina antihemofilică, GAH). Pentru activarea succesivă a acestora din urmă este necesară, în mod evident, o perioadă mai mare de timp.

Mecanismul extrinsec al formării tromboplastinei plasmatice este declanşat de factorul tisular al coagulării, care este o fosfolipoproteină macromoleculară-micelară, conţinând 49% proteine, 42% fosfolipide (inozitol- şi serinfosfatide) şi 7-9% colesterol liber. Partea proteinică a miceliilor este formată din mai mulţi monomeri peptidici cu masa moleculară de 50 000 d. În prezenţa ionilor de Ca^{++}, factorul plasmatic F-VII, o serinprotează activă din plasmă, se fixează pe suprafaţa miceliilor fosfolipidice tisulare. În urma acestei fixări F-VII începe să funcţioneze şi transformă prin proteoliză F-X (*Stuart-Prower*) inactiv în forma lui activă (F-Xa). Factorul Xa este şi el o serinprotează, care descompune legături peptidice între aminoacizii arginină şi izoleucină, punând astfel în libertate din molecula mai mare a *protrombinei* o altă serinprotează activă, *trombina*. Trombina descompune şi partea peptidică rămasă în urma scindării protrombinei în două peptide, pretrombina I şi II.

Mecanismul intrinsec al formării tromboplastinei plasmatice reprezintă activarea factorilor de contact ai coagulării.

1. **Factorii de coagulare.** În procesul complex de formare a tromboplastinei plasmatice participă numeroşi factori şi cofactori proteinici din plasmă. Factorii de coagulare propriu-zişi sunt enzime proteolitice cu acţiuni bine determinate în spaţiu şi timp, iar cofactorii sunt lipsiţi de acţiuni enzimatice, jucând numai rolul unor modulatori ai acţiunii factorilor. Astfel, *teoria de cascadă* a coagulării sanguine şi-a pierdut valabilitatea.

Actul iniţiator al acestui mecanism îl constituie *contactul direct* al sângelui ieşit din patul vascular cu fibrele de colagen sau cu alte suprafeţe rugoase străine, încărcate electronegativ. În urma acestui contact, o serinprotează inactivă, numită *factorul Williams*, se activează prin modificarea conformaţiei structurii în aşa fel, încât se descoperă miezul ei activ. Enzima activă atacă o altă proenzimă serinprotează, numită *prekalicreină* (*factorul Fletcher*). Prekalicreina are o structură peptidică monomerică, cu masa moleculară de 80 000 d, având concentraţia de 0,04 g/l în plasma normală. În urma proteolizei suferite se formează două fragmente peptidice, unul cu o masă moleculară mai mare (*H, heavy*) şi celălalt mai mică (*L, light*), care conţine miezul activ. Cele două fragmente rămân fixate între ele printr-o legătură disulfidică. Unul dintre substratele kalicreinei este o α_2-globulină din plasmă, numită *kininogen cu masa moleculară mare* (*High Molecular Weight Kininogen*, HMWK, *factorul Fitzgerald*). Această macromoleculă proteinică este fixată de lanţul H al kalicreinei, iar miezul activ, situat în lanţul L al enzimei, eliberează din ea un nonpeptid, numit *bradikinina*. Porţiunea rămasă a substratului în urma proteolizei se numeşte kininogen, cu masa moleculară mică (*Low Molecular Weight Kininogen*, LMWK, *factorul Fleaujac*). Bradikinina este un peptid purtător de semnale, care, sub formă purificată administrată local la animale de experienţă, chiar şi în cantităţi foarte mici, produce toate semnele caracteristice ale inflamaţiei descrise de Galen: *tumor, rubor, dolor* şi *calor*.

Factorul XII (F-XII, *Hageman*) este cel de-al doilea substrat specific al kalicreinei. Acest factor este tot un peptid monocatenar (β_2-globulină), cu masa moleculară de 80 000 d, care se formează în monocite, având concentraţia plasmatică de 0,3 g/l şi o perioadă de înjumătăţire de 2 zile şi jumătate. Este labil, se degradează în cursul conservării, dar nu se consumă în cursul coagulării sângelui. Prin desfacerea unei singure legături peptidice, kalicreina îl scindează în două fragmente F-XIIa α şi β, miezul activ al enzimei localizându-se în primul fragment. Factorul Hageman activ (α FXIIa) are ca substrat, pe de o parte factorul XI (Roseman) pe care îl activează tot prin proteoliză; pe de altă parte, α F-XIIa activează atât prekalicreina, cât şi plasminogenul, fapt prin care se amplifică activarea proprie prin autocataliză, dar în acelaşi timp se declanşează şi fibrinoliza (respectiv fibrinogenoliza) încă din momentul începutului formării tromboplastinei plasmatice.

Factorul XI (F-XI, *Plasma Thromboplastin Antecendent, PTA, Factorul Roseman*) este o γ_1-globulină dimerică formată în hepatocite, alcătuită

dintr-o pereche de peptide identice, cu masa moleculară de 180 000 d, fixate între ele printr-o legătură disulfidică. Concentraţia normală în plasmă este de 6, 10^{-3} g/l, are perioadă de înjumătăţire de 2 zile şi jumătate, este stabil şi nu se consumă în cursul coagulării. FXIa activează PTA prin scindarea în ambele peptide a câte unei legături peptidice, între *arginină* şi *izoleucină*. FXIa este activ numai în prezenţa HMWK (Fitzgerald). Substratul specific al FXIa îl constituie FIX (Christmas), dar şi *plasminogenul*.

Factorul IX (FIX, *Christmas*) este un peptid monomer, cu masa moleculară de 55 400 d, produs în hepatocite. FIX este stabil, nu se consumă în cursul coagulării şi are o perioadă de înjumătăţire de o zi în plasmă. PTA activ scindează în molecula FIX două legături peptidice, între *arginină* şi *alanină*, respectiv *arginină* şi *valină*. În urma acestei scindări se eliberează un fragment cu masa moleculară de 8 000 d, iar cele două lanţuri β rămase se cuplează între ele printr-o legătură disulfidică. Centrul activ al enzimei este localizat în porţiunea C-terminală a moleculei. În prezenţa ionilor de Ca^{++}, factorul FIXa fixează partea coaguloactivă a cofactorului FVIIIcoag (globulina antihemofilică, GAH). Complexul format din aceşti trei factori se fixează pe suprafaţa miceliilor fosfolipoproteinice de origine plachetară (PF-3) şi transformă prin proteoliză factorul X inactiv (Stuart-Prower) într-o serinprotează activă (FXa), fixată împreună cu cofactorul FVI (FVa) pe suprafaţa mare a PF^{-3}.

Factorul X (FX, Stuart-Prower) este o proteină cu masa moleculară relativ redusă (56 000 d) produsă în ficat şi prezentă în plasmă într-o concentraţie de 1,003 g/l. Este o substanţă stabilă, care nu se consumă în cursul coagulării, formată din 2 lanţuri peptidice (unul greu şi celălalt uşor) cuplate disulfidic între ele. FIXa eliberează prin proteoliză din lanţul greu al moleculei FX un fragment peptidic mic. Prin aceasta se descoperă centrul activ, situat în partea C-terminală a moleculei, prin care enzima devine şi ea activă (FXa). Este de remarcat că factorul Stuart-Prower poate fi activat nu numai prin mecanismul fiziologic de mai sus, ci în condiţii patologice şi de către alte serinproteaze eliberate şi activate în cursul diferitelor reacţii inflamatorii.

2. **Cofactorii coagulării** nu sunt serinproteaze, ci proteine cu efecte modulatoare (inhibitoare sau stimulatoare) asupra factorilor de coagulare. Tulburările lor înnăscute sau dobândite duc totuşi la manifestarea unor dereglări mai mult sau mai puţin grave ale hemostazei, de la unele diateze hemoragice mai uşoare, până la hemofilia A.

F-V, VI (proaccelerina, accelerina) este o proteină macromoleculară (350 000 d) produsă de macrofage, prezentă în cantităţi mici (0,01 g/l) sub formă inactivă în plasmă. Din cauza labilităţii se degradează rapid şi nu mai poate fi pusă în evidenţă nici în ser, nici în plasma veche. Ea se consumă în cursul coagulării. Nu are proprietăţi enzimatice, dar este un component al sistemului de activare a protrombinei. Lipsa congenitală rară a F-V se transmite autozomal recesiv.

F-VIII (globulina antihemofilică, GAH) este o β-macroglobulină cu masa moleculară de 2 milioane d, prezentă în plasmă în concentraţia de 0,005 g/l şi având timpul de înjumătăţire de o jumătate de zi. Se formează în hepatocite. Este un factor labil şi se consumă în cursul coagulării. Este alcătuit din 3 componente distincte: F-VIIIcoag este cofactorul activării F-X în prezenţa accelerinei (F-VI); F-VIIIagn, purtătorul determinanţilor antigenici proprii; F-VIIIvW (*von Willebrand*), cofactorul manifestării funcţiilor hemostatice plachetare. Lipsa ereditară a acestui component duce la manifestarea *angiohemofiliei* (*bolii von Willebrand*).

Factorul Williams este o preprotează serinică alosterică (forma T), sintetizată în elementele SMM, care se activează prin modificarea conformaţiei structurale (trecerea în forma R), în urma unui contact cu suprafeţele rugoase şi încărcate electronegativ. În cursul activării se descoperă miezul activ al enzimei, al cărui substrat este o altă preprotează serinică, *prekalicreina* (*Factorul Fletcher*).

Prekalicreina (*factorul Fletcher*) este o altă proenzimă serinprotează cu masa moleculară de 100 000 d, formată şi eliberată de elementele SMM care se activează prin proteoliză de către factorul Williams. Conţinutul normal în prekalicreină al plasmei normale este de 0,03 g/l. Kalicreina este un cofactor labil, dar nu se consumă în cursul coagulării.

Kininogenul macromolecular (HMWK, *factorul Fitzgerald*) este o α_2-globulină cu masa moleculară de 110 000 d, concentraţie plasmatică de 0,05 g/l şi timp de înjumătăţire de 30 de zile. Este un cofactor labil, dar nu se consumă în cursul coagulării, amplifică activitatea factorului XIa. Sub acţiunea proteolitică a kalicreinei se pune în libertate *bradichinina*.

Chininogenul cu masa moleculară redusă de 80 000 d (LMWK, *factorul Flaujeac*) reprezintă restul rămas în urma scindării proteolitice a HMWK. Are o concentraţie de 0,05 g/l în plasmă şi timpul de înjumătăţire de 30 de zile. Secvenţa aminoacidică a *bradichininei* este prezentă şi în molecula LMWK, ca urmare acest peptid purtător de semnale poate fi eliberat şi din această proteină prin proteoliză.

Proteina C este o serinprotează β-globulinică cu masa moleculară de 62 000 d, prezentă în plasmă sub forma inactivă, într-o concentraţie de 0,001 g/l. Este un cofactor stabil, care se consumă în cursul coagulării. Se formează în hepatocite în prezenţa vitaminei K. Este activată prin proteoliza limitată de *trombină*, în prezenţa *β-trombomodulinei*. Sub formă activă (PCa), în prezenţa unui alt cofactor, *proteina S* inactivează prin proteoliză cofactorii accelerină (F-VI) şi F-VIIIcoag (GAH).

Proteina S (S de la *Seattle*, oraş din SUA unde a fost identificată) este o β-glucoproteină cu masa moleculară de 69 000 d, având concentraţia plasmatică de 0,015 g/l. Se formează în hepatocite, în prezenţa vitaminei K. Este un factor stabil şi se consumă în cursul coagulării, amplifică activitatea proteolitică a proteinei C asupra cofactorilor F-Va şi F-VIIIcoag.

β-Trombomodulina este o β-globulină cu masa moleculară de 74 000 d, formată în celulele endoteliale. Pe suprafaţa endoteliului are funcţia de re-

ceptor specific al trombinei. Trombina fixată de către β-trombomodulină îşi pierde activitatea procoagulantă, inclusiv capacitatea de a activa plachetele, cofactorii F-V şi F-VIIIcoag, de a transforma fibrinogenul în fibrină.

3. Factorii de coagulare dependenţi de vitamina K

În anul 1935 s-a observat că puii care consumă o anumită iarbă ce conţine *dicumarol* sau *dicumarină*, produc o diateză hemoragică severă. Ulterior s-a constatat că dicumarina şi derivaţii săi acţionează în organism ca *antivitamine K*. În urma administrării perorale a acestor substanţe scade considerabil activitatea în plasmă a următorilor factori de coagulare: F-II (*protrombina*), F-VII (*convertina*), F-IX (*Christmas*), F-X (*Stuart-Prower*), precum şi a cofactorilor *proteină C* şi *proteină S*. Ansamblul acestor factori şi cofactori formează *grupa proteinelor inactivate prin absenţa vitaminei K* (*Proteins Inactivated by Vitamine K Absence, PIVKA*). În urma determinării cu ajutorul unor metode deosebit de sensibile (*Radio Immuno Assay, RIA*) a cantităţii în plasmă a acestor proteine s-a constatat că nu este vorba de scăderea *cantităţii*, ci numai de *scăderea activităţii* acestora. Cauza acestei scăderi o constituie faptul că în absenţa vitaminei K (respectiv în prezenţa antivitaminelor K) în hepatocite nu se activează enzima *γ-glutamil-carboxilaza*. Această enzimă transferă grupări carboxilice în poziţiepe resturi de *acid glutamic* din lanţurile peptidice ale factorilor şi cofactorilor dependenţi de vitamina K. Prezenţa grupărilor carboxilice triple în moleculele acestor proteine face posibilă pe de o parte fixarea ionilor de Ca^{++} de către factorii şi cofactorii respectivi, iar pe de altă parte şi aderarea fixă a acestora de suprafaţa micelară a fosfolipidelor de origine tisulară, respectiv plachetară (PF-3). În lipsa grupărilor γ-carboxilice din moleculele PIVKA, capacitatea lor funcţională se reduce într-o măsură considerabilă, ducând la manifestarea diatezelor hemoragice mai mult sau mai puţin grave. În molecula acestor proteine s-au pus în evidenţă şi resturi de *acid β-hidroxiaspartic*, rolul funcţional al acestora rămânând încă neelucidat.

Schema mecanismelor extrinsec şi intrinsec ale formării tromboplastinei plasmatice este prezentată în figura 96.

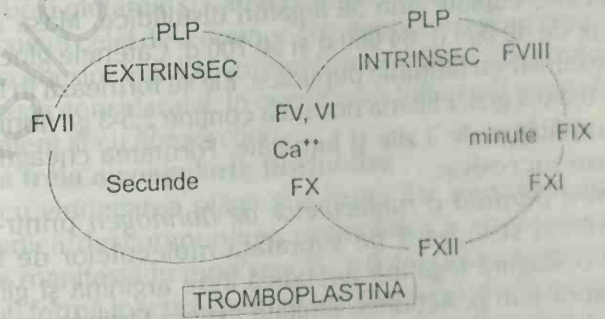


Fig. 96. Mecanismele extrinsec şi intrinsec ale formării tromboplastinei plasmatice.

b. **Faza întâi a coagulării: formarea trombinei**

Tromboplastina plasmatică activă (F-Xa, *Stuart-Prower*) activează protrombina în două faze proteolitice. În cursul primei faze, protrombina este scindată în două fragmente: primul fragment conţine în porţiunea C-terminală miezul activ al trombinei, cel de-al doilea este alcătuit din două peptide (*pretrombina* I şi II) cuplate între ele. În faza a doua, F-Xa desface în fragmentul trombinic o legătură peptidică între aminoacizii *izoleucină* şi *arginină*, din care cauză fragmentul se separă în 2 porţiuni mai mici, cuplate disulfidic între ele, având şi miezul activ descoperit. Trombina astfel activată atacă substratul ei natural, *fibrinogenul*, dar se scindează în două fragmente separate (*pretrombina* I şi II) şi fragmentul mare, dimeric, produs în cursul primei faze a activării proprii. Schema activării protrombinei este prezentată în figura 97.

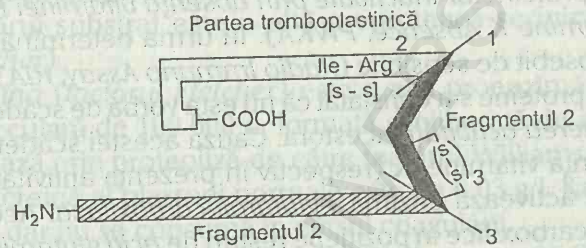


Fig. 97. Mecanismul activării protrombinei (explicaţia în text).

Rata formării trombinei active este reglată prin activarea proteinei C de către excesul de trombină. Trombina pune în libertate prin proteoliza din lanţul peptidic H al proteinei C inactive, un decapeptid, descoperind astfel centrul ei activ. La rândul ei, proteina C activată, în prezenţa cofactorului proteină S, descompune cofactorii F-VI şi F-VIIIcoag, necesari pentru activarea trombinei.

c. **Faza a doua a coagulării: formarea fibrinei**

Fibrinogenul este o glicoproteină dimerică, cu masa moleculară de 340 000 d, formată din doi monomeri, alcătuiţi din câte 3 lanţuri peptidice (α, β şi γ) fiecare, cuplate prin 56 legături disulfidice. Masa moleculară a peptidelor este de 49 000 d, 64 000 d şi 50 700 d. Catenele glucidice laterale sunt cuplate exclusiv cu lanţurile peptidice. Ele se formează în hepatocite, în cantităţi între 0,3-0,4 g/zi. Plasma normală conţine 2,5-3 g/l fibrinogen, având timpul de înjumătăţire de 3 zile şi jumătate. Formarea cheagului de fibrină are loc în 3 faze succesive:

– *Scindarea parţială a moleculelor de fibrinogen* printr-o proteoliză limitată: trombina se fixează pe suprafaţa moleculelor de fibrinogen şi descompune o singură legătură peptidică între arginină şi glicină, întâi în peptidele α, apoi şi în β. Acţiunea limitată asupra fibrinogenului se explică prin *caracterul puternic apolar* al porţiunilor învecinate punctelor de atac al trombinei. În urma acestor scindări se eliberează din capătul N-terminal al ambelor peptide câte o pereche de fragmente numite *fibrinopeptidul A* şi *B*,

cu masele moleculare de 5 000 d. Porţiunile rămase ale fibrinogenului se numesc *monomeri de fibrină*.

– *Polimerizarea monomerilor de fibrină* începe cu eliberarea celor două perechi de peptide A şi B, în urma căreia se descoperă suprafeţele puternic aderente ale capetelor N-terminale nou-formate ale acestora. Prin *cuplarea cap la cap* şi *cap la coadă* a peptidelor α şi β ale monomerilor se formează pe de o parte fibre polimere lungi, pe de altă parte şi fibre încrucişate reciproc. Astfel apare o reţea multiplă tridimensională, umplând întregul spaţiu disponibil al recipientului, sub forma *cheagului de fibrină*. Capetele aderente ale peptidelor α şi β ale monomerilor de fibrină sunt fixate deocamdată numai prin legături de hidrogen. De aceea, în cursul primelor 3-4 ore după coagulare, ele pot fi desfăcute şi cheagul poate fi dizolvat într-o soluţie de uree 6 mol. În spaţiile interfibrilare ale cheagului se includ elementele figurate ale sângelui, cu predominanţa hematiilor. Din această cauză, spre deosebire de *cheagul alb* al plachetelor, format instantaneu la nivelul leziunii vasculare, acest polimer de fibrină se numeşte *cheag roşu*.

– *Stabilizarea structurii cheagului de fibrină* este un proces enzimatic realizat de factorul de stabilizare a fibrinei (FSF, F-XIII), care constă în schimbarea legăturilor de hidrogen intercatenare α şi β cu legături covalente, stabilite de data aceasta sub forma dimerilor şi între peptidele γ. FSF este o glicoproteină tetrameră cu masa moleculară de 340 000 d, formată din câte o pereche de peptide identice, a (75 000 d) şi b (80 000 d). Centrul activ este localizat în lanţurile a. FSF se formează în hepatocite; în plasmă se găseşte sub formă inactivă, într-o concentraţie de 0,02 g/l. FSF inactiv se fixează pe suprafaţa coloanelor de fibrină şi se activează pe loc prin proteoliză de către trombină, în prezenţa ionilor de Ca^{++}, prin scindarea unei legături între arginină şi glicină în lanţurile a, în urma căreia se eliberează de la porţiunea N-terminală un peptid blocant, cu masa moleculară de 4 000 d. FFS activat se consumă rapid, astfel în unele cazuri cu tromboze venoase extinse, cantitatea lui poate să scadă considerabil. FSF acţionează în două faze, în prezenţa ionilor de Ca^{++}. Denumirea exactă a enzimei este de endo-γ-glutamin-ε-lizin transferază, care formează câte o legătură amidică covalentă între resturile de acid α-carboxi-glutamic şi ε-amino-lizină. În cursul primei faze se formează α-dimeri, în cursul celei de-a doua, γ- şi β-dimerii, precum şi polimeri multipli. Prin formarea acestor legături covalente încrucişate, stabilitatea şi rezistenţa cheagului creşte considerabil. În cursul unor inflamaţii grave, lanţurile α pot fi legate covalent şi cu *fibronectina*.

d. **Faza a treia a coagulării: fibrinoliza**

Paralel cu vindecarea plăgii şi a leziunilor microvasculare, începe şi fibrinoliza, adică descompunerea proteolitică a cheagului roşu. Această proteoliză se manifestă în mod specific printr-o altă serinprotează prezentă în plasmă sub formă inactivă, numită plasminogen, dar şi pe plan nespecific, din partea numeroaselor serinproteaze eliberate prin exocitoză din micro- şi macrofagele activate, a numeroaselor serinproteaze eliberate.

Plasminogenul este o serinprotează formată în hepatocite, prezentă sub formă inactivă în plasmă (*plasminogen* şi având timpul de înjumătăţire de 5-6 zile. Este alcătuit dintr-un singur lanţ peptidic cu masa moleculară de 91 000 d. Spre porţiunea N-terminală formată de lizină, lanţul peptidic monomer formează 5 bucle, fiecare cu o afinitate deosebită de a fixa *aminoacizi diamino-monocarboxilici*, ca *lizina* şi *arginina*. Miezul activ este situat în porţiunea C-terminală. Activarea plasminogenului are loc prin proteoliză, prin deschiderea unei singure legături amidice între aminoacizii arginină şi valină. În condiţii fiziologice, activarea se desfăşoară prin mecanismul intrinsec, într-o singură fază. Urokinaza este o serinprotează cu masă moleculară între 33 000 şi 54 000 d, formată în rinichi. Activatorul cel mai puternic şi cel mai activ al plasminogenului este activatorul tisular (ATPG), o serinprotează cu masa moleculară de 50 000 d, care se formează în celulele endoteliale şi SMM. Alături de activatorii fiziologici ai fibrinolizei şi o serie de alte serinproteaze nespecifice de origine celulară sau tisulară (kalicreina, F-XIIa, F-XIa, F-Xa, F-IXa, proteaze lizozomiale, tripsina, chimotripsina, elastaza etc.) pot transforma plasminogenul în plasmină activă (figura 98).

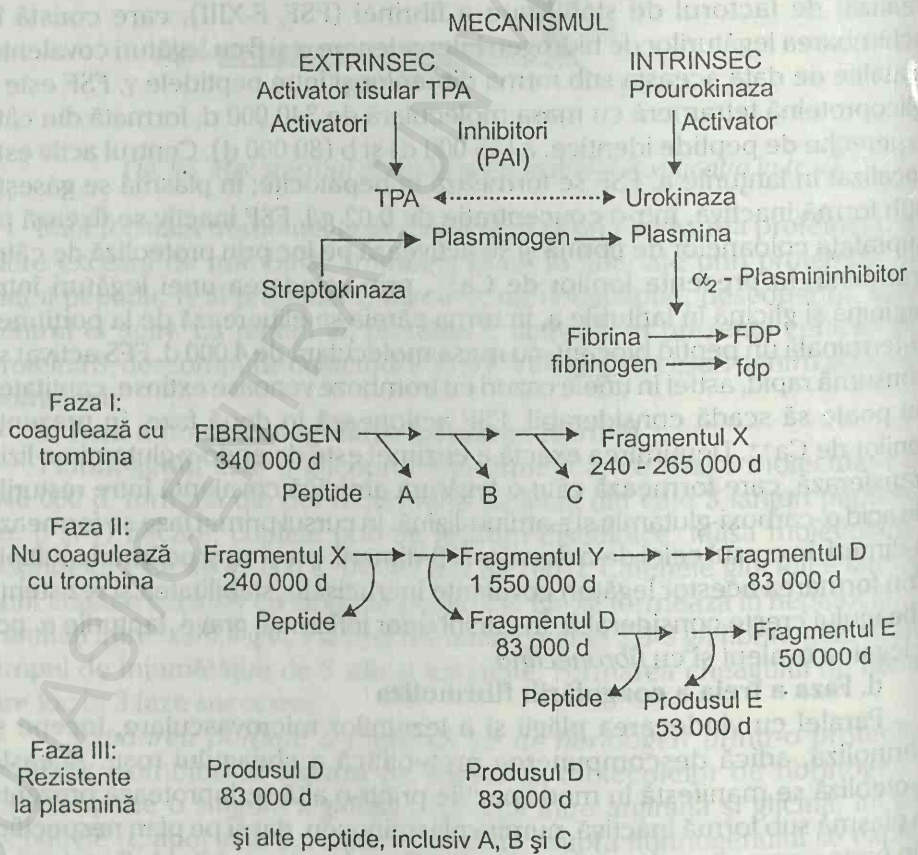


Fig. 98. Mecanismul de acţiune a plasminei.

În cadrul mecanismului extrinsec al activării plasminei funcţionează activatori exogeni, ca *streptokinaza-A*. Denumirea de *kinază* în cazul acesta este de două ori nepotrivită. În primul rând streptokinaza-A nu este o enzimă, în al doilea rând nici în acest caz nu este vorba de o activare prin fosforilare. Mecanismul extrinsec totuşi este activ şi e desfăşoară în 2 faze: streptokinaza se leagă de plasminogen şi formează cu el un complex echimolecular. Sub formă fixată, printr-o modificare structurală conformaţională, plasminogenul se activează parţial. Acest complex cu activitate proteolitică redusă transformă totuşi iniţial câteva molecule de plasminogen, care prin autocataliză realizează ulterior activarea progresivă a restului. Din cauza obţinerii ei cu uşurinţă, streptokinaza-A a fost administrată cu succes în tratamentul fibrinolitic al trombozelor coronariene şi al altor vase. Dezavantajul metodei constă în imunogenicitatea puternică a substanţei, a cărei consecinţe negative se manifestă în cazul unei administrări repetate.

Mecanismul de acţiune a plasminei este determinat de caracterul ei endoproteazic cu *spectru larg*, descompunând în mod preferenţial legăturile peptidice ale *argininei*. Astfel, plasmina activează prin proteoliză şi o serie de alte preproteaze (prekalicreina, F-XII, F-XI, protrombina), în *vitro* descompune gelatina şi cazeina. Este de remarcat că deşi substratul obişnuit al plasminei este fibrina, în cazurile în care ea este prezentă în exces, descompune atât fibrinogenul nativ, cât şi majoritatea factorilor şi cofactorilor de coagulare din plasmă. În urma activării sale prin buclele aderente de lizină, plasmina se fixează pe suprafaţa fibrelor de fibrină din cheag, din care eliberează prin proteoliză o serie de *produşi de degradare a fibrinei* (*fdp*). Aceşti produşi sunt totdeauna *dimeri*, deoarece provin din peptidele învecinate (α, β şi γ), legate covalent în urma activităţii FSF. Plasmina atacă şi fibrinogenul plasmatic în mai multe puncte, eliberând o serie de *produşi de degradare a fibrinogenului* (*FDP*). În cursul primelor 3 minute ale activării, plasmina eliberează prin proteoliză câte un fragment (A, B şi C) din toate trei peptidele (α, β şi γ). Restul de fibrinogen se numeşte fragment X şi are masa moleculară de 240 000 d. În decurs de încă 4 minute, fragmentul X se scindează în 2 fragmente noi: *fragmentul D* cu masa moleculară de 100 000 d şi *fragmentul Y* cu masa moleculară de 150 000 d. Cel din urmă este scindat rapid într-un nou *fragment D* şi un *fragment E*, cu masa moleculară de 50 000 d. În cursul fazei terminale a fibrinogenolizei se produc numai fragmente D şi E. FDP sunt totdeauna *monomeri*, spre deosebire de fdp, care în urma activităţii transglutamidazice a FSF, formează exclusiv dimeri, ca DD/E, YD/DY, YY/DXD. Figura 99 prezintă schematic mecanismul fibrinolizei şi al fibrinogenolizei.

Inhibitorii fiziologici ai plasminei sunt antiproteazele din lichidele biologice ale organismului, ca α_1 antitripsina, α_2-antiplasmina, α_2-macroglobulina. Pe plan farmacologic, activitatea plasminei este inhibată de analogii structurali ai aminoacizilor diamino-monocarboxilici, ca acidul epsilon-aminocaproic (EACA), acidul para-aminometilbenzoic (PAMBA) şi acidul aminometilciclohexanic (AMCHA).

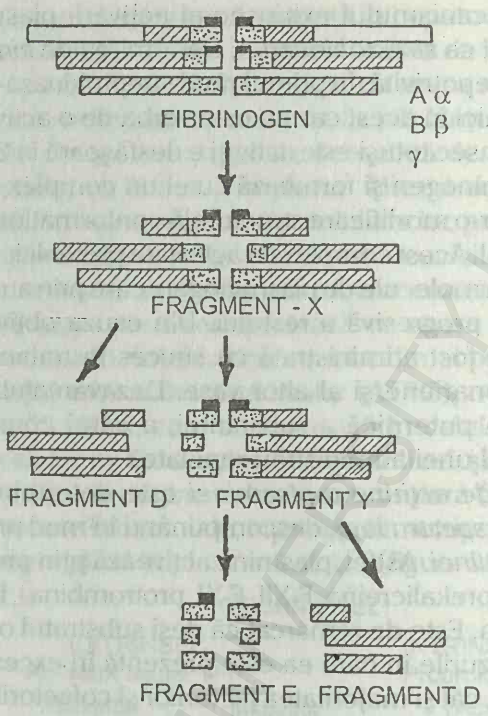


Fig. 99. Mecanismul fibrino(geno)lizei.

e. Faza a patra a coagulării: retracţia cheagului

Cheagul roşu de fibrină ocupă întregul spaţiu disponibil al recipientului. În decurs de 1-5 ore, această masă difuză se retrage prin sinereză şi presează spre exterior un volum de ser, corespunzând cu 40-60% din volumul total al sângelui. În ser pot fi puşi în evidenţă numai acei factori şi cofactori care nu se consumă sau se consumă parţial în cursul coagulării. Elementele figurate rămân incluse în cheagul retras. Retracţia este condiţionată de numărul şi starea funcţională (aderenţă, contractibilitate) a plachetelor, dar şi de cantitatea fibrinogenului plasmatic, de cantitatea şi activitatea trombinei, a FSF, de numărul hematiilor şi al leucocitelor. Modificările patologice ale aspectului şi solidităţii cheagului, perceptibile cu ochiul liber, sunt de o importanţă practică însemnată.

Reglarea hemostazei

Într-un volum de 10 ml sânge se găseşte o cantitate suficientă (1,5 mg) de protrombină, care, în urma activării sale, poate declanşa *coagularea întregului volum volum plasmatic circulant*. Faptul că o asemenea coagulare intravasculară diseminată sau difuză (CIVD), chiar şi în urma unor leziuni vasculare serioase se manifestă deosebit de rar, se datorează existenţei şi funcţionării unor mecanisme de reglare complexe, care, prin interacţiunile lor multiple, asigură de la moment la moment menţinerea echilibrului

efectelor pro- şi anticoagulante.

Dat fiind că enzima-cheie a coagulării plasmatice o constituie trombina, marea majoritate a efectelor anticoagulante sunt îndreptate împotriva trombinei şi manifestate de către diferitele *antitrombine* (AT), numerotate cu cifre romane:

Antitrombina-I (AT-I) este reprezentată de cheagul de fibrină însuşi. Trombina activă, fixată pe suprafaţa monomerilor de fibrină, este cuprinsă în interiorul cheagului şi astfel se bochează în desfăşurarea generalizată a activităţii. Însă, în urma unei fibrinolize marcante şi rapide, pot fi eliberate din cheagul lizat cantităţi însemnate de trombină activă.

Antitrombina-II (AT-II) înseamnă activitatea globală a antiproteazelor din plasmă, nespecifice trombinei (α_1-antitripsina, α_2-macroglobulina, inter--α--antichimotripsina, inhibitorul esterazei C_1 etc.). Activitatea antitrombinică a acestora este însă limitată.

Antitrombina-III (AT-III) reprezintă singurul inhibitor specific al trombinei. Este o glicoproteină formată dintr-un singur peptid, cu masa moleculară de 58 000 d, prezentă în plasma normală în cantităţi între 0,1-0,12 g/l. AT-III formează complexe echimoleculare (1:1) cu trombina, blocându-i miezul activ. Pentru aceasta are, însă, nevoie de prezenţa unui cofactor, *heparina*. În prezenţa heparinei, activitatea AT-III creşte de circa o mie de ori, din cauza unei modificări conformaţionale în molecula AT-III prin care se amplifică afinitatea acesteia faţă de trombină. Cu excepţia FXa, AT-III nu este activă împotriva altor serinproteaze. Este de remarcat însă faptul că AT-III se consumă în cursul coagulării. Ca urmare, în cazul unor coagulopatii prin consum se poate întâmpla ca heparina administrată în scop terapeutic să nu fie activă, din cauza lipsei din plasmă a AT-III. În asemenea cazuri, paralel cu tratamentul heparinic, se recomandă şi administrarea concomitentă a plasmei.

Heparin Cofactor II (HP-II) este o antiprotează glicoproteinică, cu masa moleculară de 65 000 d, având concentraţia normală în plasmă de 0,01 g/l. HP-II inhibă trombina în mod similar, ca şi AT-III, dar nu şi FXa. În cazurile rare ale lipsei congenitale a HP-II apare o predispoziţie uşoară pre tromboze, ceea ce pledează pentru rolul secundar al acestui factor în reglarea hemostazei.

Hirudina din saliva lipitoarelor este un peptid cu masa moleculară de 6 000 d, care inhibă direct trombina, fără prezenţa unui cofactor.

Antitrombina-IV (AT-IV) este reprezentată de cele două peptide (*pretrombinele* I şi II) eliberate în cursul activării protrombinei. Aceste peptide se fixează pe suprafaţa trombinei şi îi blochează centrul activ. Pretrombina II are un efect inhibitor şi asupra polimerizării monomerilor de fibrină.

Antitrombina-V (AT-V) reprezintă suma efectelor complexe antitrombinice ale unor imunoglobuline libere (autoanticorpi) sau cuprinse în particulele complexelor imune circulante, care, fixându-se de trombină, pot bloca, parţial sau total, miezul ei activ.

Antitrombina-VI (AT-VI) – cuprinde produşii de degradare (FDP: fragmentele D, X, Y, E) şi combinaţiile acestora, eliberate în cursul degradării

fibrinogenului din plasmă. Aceste fragmente blochează pe de o parte centrul activ al trombinei, pe de altă parte inhibă formarea şi polimerizarea monomerilor de fibrină. Fragmentele X îşi păstrează coagulabilitatea, care poate fi declanşată prin adăugarea *în vitro* la plasmă a etanolului sau a sulfatului de protamină. Fenomenul se numeşte paracoagulare şi este folosit ca test de laborator în explorarea stărilor de *coagulare intravasculară diseminată* (CIVD).

Proteina C este o serinprotează de origine hepatică, care în prezenţa cofactorului proteina S descompune cofactorii FV, VI şi $FVIII_{coag}$. Proteina C este activată de excesul de trombină şi inactivată de o altă protează glicoproteinică, cu masa moleculară de 57 000 d, numită inhibitor-APC, având concentraţia în plasmă de 0,005 g/l.

Rolul fundamental al serinproteazelor în hemostază

Majoritatea factorilor de coagulare sunt serinproteaze, la fel ca şi cele eliberate din micro- şi macrofage în cursul inflamaţiilor. Aceste serinproteaze se pun în libertate sau se găsesc în lichidele biologice, inclusiv plasmă, sub forma proenzimelor inactive, care se activează tot prin proteoliză de către alte serinproteaze deja active. Ca urmare, activarea prin proteoliză sau prin contact a unui singur fel de serin protează, poate să ducă practic la activarea tuturor proenzimelor de acest gen. Ansamblul acestor enzime (*proteine scindatoare de proteine*) formează în organism un *sistem proteolitic autoamplificator*, cuprinzând numeroşi reprezentanţi ai enzimelor lizozomiale, leucocitare şi plachetare, ai factorilor de coagulare, de properdină şi de complement. Activitatea individuală şi globală a acestora este însă controlată în spaţiu şi timp de către antiproteazele din plasmă şi din lichidul interstiţial. Ca urmare, gradul de manifestare a unei coagulopatii, respectiv gravitatea şi extinderea unei inflamaţii, sunt determinate de raportul momentan între activitatea serinproteazelor şi a antiproteazelor.

Tulburările înnăscute şi dobândite ale fazei plasmatice a coagulării: coagulopatiile

Tulburările formării şi degradării enzimatice ale cheagului de fibrină se numesc coagulopatii, care se pot grupa astfel:

Hipocoagulopatii cu scăderea au lipsa coagulabilităţii sângelui, ca: defectcoagulopatiile, cu lipsa sau scăderea ereditară sau achiziţionată a unuia sau rareori mai multor factori sau cofactori de coagulare; coagulopatiile prin consum, în urma consumării rapide a fibrinogenului (printr-o fibrinoliză excesivă) sau/şi a altor factori sau cofactori; *coagulopatiile prin exces de anticoagulanţi* (*inhibitori*); coagulopatii autoimune, nespecifice prin complexe imune circulante şi specifice, prin producerea autoanticorpilor împotriva unuia sau rareori mai multor factori sau cofactori de coagulare.

Hipercoagulopatii cu creşterea mai mult sau mai puţin gravă a coagulabilităţii; sunt totdeauna dobândite, manifestându-se în urma unor inflamaţii vasculare locale sau generalizate (CIVD).

A. **Hipocoagulopatiile**

Scăderea sau absenţa coagulabilităţii sângelui poate fi atât *înnăscută*, cât şi *dobândită*. Stările de hipocoagulabilitate ereditară, în marea lor majoritate sunt transmise autozomal recesiv, respectiv legate de cromozomul X (hemofilia A şi B) şi se manifestă prin lipsa unui anumit factor sau cofactor de coagulare. Hipocoagulopatiile dobândite apar pe plan secundar, în urma unor tulburări funcţionale sau unor leziuni hepatice şi/sau inflamatoare şi sunt caracterizate prin scăderea simultană a cantităţii sau a capacităţii funcţionale a mai multor factori sau cofactori de coagulare. În cursul hepatitelor acute, cronice sau toxice scade paralel activitatea factorilor dependenţi de vitamina K (FII, FVII, FIX şi FX), ca şi la prematuri, la nounăscuţi cu boala hemolitică din cauza incompatibilităţii Rh şi la bolnavii sub tratament excesiv cu antivitamine K. În cazul unor hepatopatii grave (ciroza hepatică) scade şi cantitatea fibrinogenului (FII) precum şi a cofactorului FV, VI în plasmă. Cantitatea fibrinogenului plasmatic scade rapid şi în cursul coagulopatiilor prin consum, chiar până la dispariţia lui totală.

a) **Hipocoagulopatiile ereditare**

1) *Afibrinogenemia* este o boală ereditară rară, transmisă recesiv, autozomal. Coagularea plasmei lipsită cu desăvârşire poate fi corectată prin adăugarea plasmei sau a fibrinogenului purificat şi dizolvat. Timpul biologic de înjumătăţire a fibrinogenului în plasmă fiind de 3 zile, o perfuzie cu plasmă (cu un volum conţinând 8-10 g fibrinogen) acoperă necesarul în fibrinogen al organismului bolnav pentru o perioadă de 4-5 zile. La bolnavii cu afibrinogenemie ereditară se remarcă lipsa sedimentării hematiilor din sângele recoltat pe citratul de Na, valoarea VSH fiind egală cu zero.

2) *Disfibrinogenemiile*. Tulburările ereditare ale biosintezei fibrinogenului în hepatocite, inclusiv ale celor 3 tipuri de lanţuri peptidice şi a catenelor laterale glucidice, se pot manifesta sub mai multe forme:

– Anomaliile structurale fără apariţia tulburărilor funcţionale. Aceste variante ale moleculelor de fibrinogen, ca şi celelalte, sunt denumite după numele oraşului unde au fost descoperiţi bolnavii respectivi: fibrinogenul de la Valencia, Parma, Vancouver, Viena, Iowa City, Los Angeles, Montreal I şi II etc.

– Anomaliile structurale cu tulburarea funcţională a monomerilor. Până în momentul de faţă au fost descrise 25 de variante, ca fibrinogenul de la Amsterdam, Zürich I şi II, Manila, Paris I, II şi III etc.

– Anomaliile cu tulburarea polimerizării longitudinale a fibrinopeptidelor A şi B. Până în prezent au fost identificate 8 variante: fibrinogenul de la Gießen, Cleveland I şi II, Baltimore, Bethesda I şi II, Detroit, Metz, New York.

– Anomaliile cu tulburările polimerizării transversale; au fost descrise 3 variante: fibrinogenul de la Oklahoma, de la Tokio şi de la Oslo.

3) *Hipoprotrombinemia ereditară* este o boală ereditară foarte rară, transmisă autozomal recesiv, cu scăderea cantităţii protrombinei plasmatice sub 10% a valorii normale. La bolnavi timpul trombinei este între limitele normale, timpul Quick este însă foarte alungit.

4) *Parahemofilia, lipsa ereditară a cofactorului V*, este o boală ereditară foarte rară, transmisă autozomal recesiv. Primul bolnav cu această boală a fost descris de P. *Owren*, în anul 1947. Boala se manifestă la ambele sexe cu hemoragii gingivale şi nazale masive, respectiv cu pierderi masive de sânge în cursul ciclului menstrual. Bolnavii prezintă timpul Quick alungit, cantitatea cofactorului FV foarte scăzută sau absentă, consumul de protrombină foarte redus. Timpul Quick alungit se corectează cu plasmă normală proaspătă, nativă sau adsorbită, însă nu cu plasmă veche.

5) *Hemofilia A, lipsa ereditară a cofactorului FVIII$_{coag}$*, este forma cea mai frecvent întâlnită a coagulopatiilor ereditare. Se transmite recesiv, legat de sex, alelele lezate fiind localizate atât în cromozomul X, cât şi Y. Boala este deci transmisă de femei, dar se manifestă numai la bărbaţii homozigoţi (X, Y). La 35-50% din bolnavii cu hemofilia A lipsesc antecedentele familiare, deci apare posibilitatea modificării structurale şi funcţionale a alelelor prin mutaţii spontane, cu o frecvenţă aproximativă de 3:100 000. Într-o proporţie de 10%, manifestarea unui sindrom de hemofilie A, numit *hemofilie A prin corpi inhibanţi*, poate fi cauzată de autoanticorpi produşi împotriva FVIII$_{coag}$. Atât varianta ereditară, cât şi cea autoimună a bolii se pot manifesta sub formă uşoară, medie şi gravă. Ea se reflectă prin valorile cifrice obţinute ale consumului de protrombină scăzut şi ale testului de generare a tromboplastinei (*Biggs, Douglas*), în cursul cărora timpul de coagulare alungit sau absent al plasmei bolnavului poate fi corectat exclusiv prin adăugarea plasmei normale (sau a unui bolnav cu hemofilia B), proaspete, nativă sau adbsorbită cu $Al(OH)_3$.

Angiohemofilia sau lipsa FVIII$_{vW}$ (boala v. Willebrand) este prezentată în cadrul tulburărilor fazei vasculoplachetare a hemostazei.

6) *Hemofilia B, lipsa congenitală a FIX* (*Christmas*), apare cu o frecvenţă imediat apropiată hemofiliei A. Se transmite în mod similar recesiv şi legat de sex (X şi Y). Simptomatologia bolii este similară cu cea a formei A. Într-o proporţie de 1-3%, forma numită hemofilia prin corpi inhibanţi a bolii se manifestă tot din cauza producerii *autoanticorpilor anti-FIX*. Timpul de coagulare alungit sau absent al plasmei bolnavului poate fi corectat prin adăugarea plasmei (serului) *vechi normale* sau obţinute de la un bolnav cu hemofilia A, dar în nici un caz cu preparate identice adsorbite de sulfatul de bariu.

7) *Lipsa ereditară a FX, Stuart-Prower*, este o boală ereditară rară, transmisă autozomal recesiv, manifestându-se exclusiv la homozigoţi. La aceşti bolnavi, formarea tromboplastinei plasmatice este foarte redusă sau absentă prin ambele mecanisme (extrinsec şi intrinsec). În cazul lipsei ereditare a FVII este afectată numai funcţionarea mecanismului extrinsec, în cel intrinsec formarea tromboplastinei este nealterată. La bolnavii cu lipsa ereditară a FX, timpul Quick este alungit şi poate fi corectat în *vitro* prin adăugarea plasmei vechi, dar nu cu cea adsorbită de sulfatul de bariu.

Formele dobândite ale scăderii funcţionării FX se pot manifesta în cursul unor leziuni hepatice grave, însoţite de tulburările celorlalţi factori de coagulare dependenţi de vitamina K (PIVKA).

8) *Lipsa ereditară a FXI* (*PTA, Roseman*) este o boală ereditară rară, transmisă autozomal şi aproape dominant. La bolnavi apar hemoragii masive în urma traumatismelor sau intervenţiilor chirurgicale. Ei prezintă *timpul de sângerare* normal, însă *timpul de recalcificare* alungit. Timpurile modificate de coagulare se corectează în *vitro* prin adăugarea serului şi plasmei vechi native sau adsorbite de sulfatul de bariu, precum şi cu plasma unui bolnav cu hemofilie B.

9) *Lipsa ereditară a FXII* (*Hageman*) este o boală ereditară relativ rară, manifestată la ambele sexe, transmisă autozomal recesiv. Deşi la bolnavi *timpul de coagulare venoasă* este alungit, în *vivo* nu prea apar hemoragii posttraumatice sau postoperatorii. Totuşi, ei prezintă o predispoziţie pentru hemoragii spontane; primul bolnav (cu numele *Hageman*) la care s-a identificat lipsa ereditară a FXII a murit din cauza unei hemoragii pulmonare grave. Bolnavii prezintă timpul de recalcificare alungit, consumul de protrombină redus. Aceste modificări pot fi corectate în *vitro* prin adăugarea serului sau a plasmei obţinute de la *orice bolnav cu oarecare coagulopatie înnăscută*, natural cu excepţia lipsei FXII.

10) *Lipsa ereditară a FXIII* (*FSF, endo- γ-glutamil- ε-lizil-transferazei*) este tot o boală ereditară rară, manifestată la ambele sexe, transmisă autozomal recesiv. Simptomele se manifestă într-o măsură mai accentuată la homozigoţi, chiar imediat după naştere se manifestă cicatrizarea întârziată a plăgii cordonului ombilical. Mai târziu apar sufuziuni, echimoze posttraumatice, postoperatorii, dar fără apariţia hemoragiilor spontane. Sângele recoltat se coagulează normal, cheagul este însă fragil şi poate fi dizolvat într-o soluţie de uree 5 mol/l sau de acid monoiodacetic 1 g %, chiar şi cu o zi în urma formării cheagului. Defecţiunea poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea plasmei vechi. Funcţiile plachetare, precum şi cantitatea şi funcţiile celorlalţi factori de coagulare sunt normale.

11) *Lipsa sau tulburările ereditare ale factorilor de contact sunt*:

– Lipsa ereditară a factorului Williams duce la activarea deficitară sau lipsită a prekalicreinei respectiv a FXII (Hageman). Defecţiunea poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea plasmei normale la plasma obţinută de la bolnav.

– Lipsa ereditară a factorului *Fletcher* (*prekalicreinei*) are simptome similare. Defecţiunea poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea plasmei normale adsorbite de sulfatul de bariu.

– Lipsa ereditară a factorului Flaujeac (HMWK) duce la activarea deficitară a FXII. Tulburarea poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea la plasma bolnavului a unei plasme normale, adsorbită pe sulfat de bariu.

– Lipsa ereditară a factorului *Fitzgerald* (LMWK) este caracterizată prin activarea deficitară a FIX (PTA) şi a FII (plasminogen). Tulburarea se corectează în *vitro* prin adăugarea plasmei proaspete activată prin contact (conţinând XIIa).

Starea funcţională a factorilor de contact joacă un rol important şi în patomecanismul *inflamaţiilor microvasculare hipersenzitive leucocitoclastice*.

b) **Disfibrinogenemiile secundare, dobândite**

În cursul evoluţiei leziunilor hepatocitare grave (ciroza hepatică), a unor inflamaţii cronice severe (artrita reumatoidă, poliartrita cronică evolutivă, alte imunopatii cronice evolutive) se pot manifesta diferite anomalii structurale ale peptidelor şi catenelor laterale glucidice, urmate de manifestarea diferitelor tulburări funcţionale ale polimerizării şi ale fibrino(geno)lizei.

c) **Coagulopatiile prin consum**

Scăderea marcantă sau lipsa totală a coagulării sanguine în cursul acestor stări patologice dobândite deosebit de grave este cauzată printr-o activare excesivă a protrombinei. Creşterea temporară, dar importantă, a coagulabilităţii duce la consumarea rapidă a cantităţii totale a fibrinogenului plasmatic, dar şi la degradarea proteolitică a celorlalţi factori (FII) şi cofactori (FV, $FVIII_{coag}$) ai coagulării.

Coagularea intravasculară diseminată (CIVD). Formarea cheagurilor multiple în interiorul vaselor din diferitele regiuni ale organismului poate fi cauzată de o mulţime de factori fizici (contactul direct cu suprafeţe rugoase), chimici (substanţe procoagulante) şi biologici (pătrunderea fosfolipidelor tisulare, a activatorului tisular al plasminogenului şi/sau a serinproteazelor de origine granulocitară sau monocitară) capabili să activeze mecanismele extrinsec sau intrinsec ale formării tromboplastinei. Primele cantităţi de proteaze activate iniţial, acţionează autocatalitic prin proteoliză în mod exploziv şi asupra celorlalte proenzime. În cazul în care intensitatea acestei autocatalize devine atât de mare, încât consumă rapid întreaga cantitate a antiproteazelor existente, proteoliza se extinde fără limite şi duce la activarea fără deosebire a factorilor trombogenetici şi trombolitici. Astfel apar focare trombogenetice şi trombolitice diseminate de-a lungul vaselor, ducând la prăbuşirea circulaţiei sângelui. În urma consumării totale a fibrinogenului plasmatic, sângele nu se mai coagulează nici în *vivo*, nici în *vitro*. Administrarea unui anticoagulant cu acţiune rapidă (heparina în prezenţa antitrombinei III) inhibă rapid coagularea excesivă şi opreşte consumarea excesivă a fibrinogenului.

Fibrinogenoliza primară generalizată este o formă dobândită, mai rară, a coagulopatiilor prin consum. Apare în cursul inflamaţiilor severe şi extinse. Ea se manifestă prin activarea excesivă a plasminogenului din plasmă, fie prin mecanismul intrinsec, fie prin cel extrinsec. Fibrinogenul se degradează rapid, fără să fie polimerizat în prealabil în fibrină. Produşii de degradare ai fibrinogenului eliberaţi în prima fază a degradării (FDP, fragmentele X şi Y) îşi păstrează coagulabilitatea sub acţiunea trombinei. Ca urmare, formează un cheag labil, care se şi degradează rapid. Fenomenul se numeşte paracoagulare şi poate fi declanşat în *vitro* prin adăugarea etanolului sau a sulfatului de protamină la plasma bolnavului. În urină se elimină FDP monomeri şi mult mai puţin produşi de degradare ai fibrinei (FDP dimeri). Administrarea inhibitorilor plasminei (EACA, PAMBA, AMCHA) opreşte rapid fibrinogenoliza excesivă.

Coagulopatiile secundare supradozării de anticoagulanţi. Din cauza administrării în doze excesive a unor substanţe nesteroidice cu acţiune

antiinflamatoare şi antiplachetare sau cu efect inhibitor asupra trombinei (heparina) sau altor proteaze (aprotinina), respectiv cu acţiune K-antivitaminică, se manifestă diferite stări hemoragice, inclusiv hematurii. Timpul venos de coagulare alungit nu poate fi corectat în *vitro* prin adăugarea la plasma bolnavului a nici unui factor sau derivat plasmatic cu compoziţie cunoscută. Neutralizarea substanţei respective (de ex. a heparinei în *vitro* cu albastru de toluidină sau sulfat de protamină), însă, restabileşte rapid echilibrul perturbat.

d) **Coagulopatiile autoimune**. Autoanticorpii produşi împotriva unor factori sau cofactori de coagulare, dar şi unele complexe imune circulante fixate prin adsorbţie pe suprafaţa acestora sau a plachetelor, pot cauza modificări numerice şi tulburări funcţionale mai mult sau mai puţin grave ale acestora. Astfel, se cunosc cazuri de trombocitopenie autoimună, de hemofilie A şi B prin *corpi inhibanţi*. Autoanticorpii pot apărea la bolnavi cu boli autoimune cronice, la bolnavi politransfuzaţi, dar şi în cursul unor infecţii virale cronice.

B. **Hipercoagulabilitatea**

Fluiditatea sângelui circulant este asigurată de suprafaţa netedă a endoteliului vascular, factor principal în menţinerea echilibrului între fibrinogeneză şi fibrinoliză. În cazul distrugerii locale a acestui echilibru din cauza traumatismului şi/sau a inflamaţiei se produc tromboze, embolii, tromboflebite, iar pe plan general se poate manifesta CIVD.

Explorarea de laborator a hemostazei

Pentru explorarea de laborator a hemostazei sunt folosite întâi teste globale de orientare, care pe de o parte semnalizează gravitatea tulburării, pe de altă parte indică faza sau fazele afectate. După obţinerea acestor informaţii se trece la analiza diferenţiată a fazelor vasculoplachetare şi a celor plasmatice, prin folosirea metodelor specifice.

A) *Testele globale pentru explorarea hemostazei*:

– *Timpul capilar de sângerare şi de coagulare*: 2-3 minute. Se utilizează pentru aprecierea globală a funcţiilor vasculoplachetare.

– *Timpul venos de coagulare*: 4-6 minute. Serveşte pentru aprecierea globală a fazei plasmatice a coagulării, semnalarea coagulopatiilor înnăscute sau dobândite.

– *Timpul de recalcificare*: la plasma obţinută din sângele recoltat pe oxalat de Ca se adaugă soluţie de $CaCl_2$. Timpul ce trece până la coagularea plasmei este egal cu viteza formării tromboplastinei plasmatice: 4-6 minute. Timpul se alungeşte, de asemenea, în cazul coagulopatiilor înnăscute sau dobândite.

B) *Testele specifice pentru explorarea hemostazei*:

a) *Explorarea fazei vasculoplachetare*:

– *Proba cu garoul* (*Rumpell-Leed*): peteşii sau echimoze apar în trombocitopenii sub 50 000 plachete/μl, în trombocitopatii şi în vasculopatii (hiperfibrinogenoliză).

– *Numărătoarea plachetelor/μl*, aprecierea coloraţiei şi a aspectului morfologic în frotiul periferic colorat.

– *Testul de retenţie*: măsurarea timpului de scurgere a sângelui recoltat pe citrat de sodiu printr-un tub conţinând perle de sticlă sau fibre de vată de sticlă, care prin aderarea lor, reţin plachetele din sânge. Valoarea normală: 6-7 minute. În cazul creşterii agregabilităţii timpul de scurgere creşte, în caz de hipoagregabilitate el se scurtează.

– În plasma bogată în plachete, obţinută din sângele recoltat pe heparină, sedimentat spontan sau centrifugat la 1 000 t/minut, agregabilitatea plachetelor poate fi apreciată, respectiv măsurată, în urma adăugării succesive a diferiţilor agreganţi (adrenalina, ADP, colagen, ristocetina etc.), cu ajutorul următoarelor metode: studiul microscopic al agregabilităţii în picături de plasmă bogată în plachete, aplicate pe lame; studiul fotometric al agregabilităţii plachetare prin citirea creşterii în timp a densităţii optice a plasmei la 432 nm în cuve de 1 cm. Această metodă face posibilă şi delimitarea în timp a celor două faze (reversibilă şi ireversibilă) ale activării plachetelor.

– Fracţionarea electroforetică în gel de acrilamidă şi identificarea glicoproteinelor caracteristice de membrană ale plachetelor. În acest scop, plachetele se izolează prin centrifugarea plasmei bogate în acestea, se lizează cu soluţie de saponină sau prin congelări şi topiri succesive, glicoproteinele din membrană se extrag cu dodecilsulfat şi se fracţionează electroforetic în gel de acrilamidă.

b) *Explorarea fazei plasmatice a coagulării*:

– *Timpul de protrombină* (*TPT, timpul de tromboplastină, timpul Quick*): plasma oxalatată recalcificată se coagulează în prezenţa tromboplastinei tisulare (TP, „*kinaza*") în 12-25 secunde. Ionii de Ca++, TP şi fibrinogenul fiind prezenţi în exces, *factorul limitant* al vitezei tromboplastino-formării îl constituie *cantitatea protrombinei*. Plasma normală oxalatată veche coagulează lent. Alungirea coagulării poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea serului proaspăt separat. În cazul lipsei FVII şi/sau a FXI, alungirea poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea serului normal vechi. Timpul Quick alungit în cazul lipsei de FX poate fi normalizat în *vitro* prin adăugarea plasmei normale proaspete.

– Indicele protrombinic a fost mult timp folosit pentru exprimarea cantitativă a scăderii coagulabilităţii, atât la bolnavi cu tulburarea ereditară sau dobândită a hemostazei, cât şi la cei aflaţi sub tratament anticoagulant. Metoda exprimă scăderea procentuală (de la 100% până la 0%) a coagulabilităţii plasmei, în comparaţie cu diluţiile procentuale corespunzătoare (de la 9:1 până la 1:9) ale unei plasme normale de control. Dat fiind că aceste valori procentuale nu prezintă linearitatea necesară faţă de cele reale, tocmai la valorile critice din punct de vedere terapeutic, metoda a fost înlocuită cu prezentarea simultană a valorilor timpului Quick, exprimate în secunde, măsurate în plasma bolnavului şi în cea de control.

– *Timpul parţial de protrombină* (TPPT) se determină timpul de coagulare al plasmei recalcificate, fără adăugarea „kinazei" (TP tisulare), care în condiţii

normale se situează între 5-6 minute. Valoarea TPPT creşte şi în cazuri în care TPT este *normal* (în trombocitopenii, trombastenii, hemofilii). Alungirea TPPT poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea unui extract plachetar, respectiv a plasmei normale proaspete ($FVIII_{coag}$) sau a serului normal vechi (FIX).

– *Consumul de protrombină*: în urma determinării TPT al unei plasme normale (de control), se îndepărtează protrombina prin adsorbţie cu sulfat de bariu. TPT se determină şi din serul proaspăt de bolnav ', precum şi după o păstrare de 3 ore la temperatura camerei. În condiţii fiziologice, TPT al plasmei adsorbite şi amestecate cu serul de bolnav, scade cu 50-70%. Aceasta înseamnă că în condiţii normale 50-70% din protrombină se consumă în cursul formării trombinei. În hemofilii activitatea iniţială a TPT nu se modifică (protrombina nu se consumă), în stări trombotice poate să scadă chiar şi până la zero (consumarea întregii cantităţi a protrombinei).

– Testul de generare a tromboplastinei (*Biggs, Douglas*). Se prepară un amestec format din plasmă normală adsorbită cu hidroxid de aluminiu (lipsă $FVIII_{coag}$), suspensie plachetară (prezenţa PF3), ser normal (prezenţa FIX) şi clorură de calciu. Din acest amestec se iau cantităţi egale (0,1 ml) din minut în minut şi se adaugă la plasma oxalatată de analizat. În momentul în care, în urma adăugării acestui volum, plasma se coagulează în 8-12 secunde, s-a produs tromboplastina plasmatică. În cazul unei plasme normale, aceasta are loc în 3-4 minute. În cazul în care coagularea plasmei de analizat întârzie, în vederea identificării factorului care lipseşte, se adaugă succesiv câte 0,1 ml din preparate de plasmă sau ser, cu absenţa selectivă a unui anumit factor cunoscut. De ex., plasma proaspătă adsorbită cu hidroxid de aluminiu nu conţine cofactorul FV, dar dispune de cofactorul $FVIII_{coag}$, care dispare, însă, din plasma veche, fiind un factor labil. Plasma normală veche (conţinând FIX) corectează în *vitro* lipsa coagulării în hemofilia B, dar nu şi în A; absenţa coagulării plasmatice la hemofilici poate fi corectată în *vitro* prin adăugarea reciprocă (de la A la B şi invers) a plasmelor proaspete (în caz de hemofilie B, coagularea absentă poate fi corectată chiar şi cu plasma veche de la un bolnav cu hemofilia A). Adăugarea serului vechi normal la plasma unui bolnav cu lipsa congenitală a FXI (PTA) corectează formarea alungită a tromboplastinei tisulare etc. Pe această cale pot fi identificaţi toţi factorii şi cofactorii de coagulare. În acest scop sunt folosite recent metode mult mai specifice şi sensibile, ca RIA (*Radio Immuno Assay*) şi ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

– *Explorarea de laborator a factorilor de contact*. Sângele se recoltează şi plasma obţinută se ţine într-o eprubetă siliconată, în vederea evitării activării factorilor prin contactul cu suprafaţa rugoasă, electronegativă. Se adaugă probei cantităţi egale din preparate separate, conţinând factorii respectivi: FXIIa, F-Fitzgerald, F-Fletcher şi F-Flaujeac. Preparatul, care restabileşte timpul normal al formării tromboplastinei plasmatice în vasul siliconat, conţine factorul de contact absent în plasma de analizat.

C) **Explorarea de laborator a antitrombinelor:**

– *Determinarea activităţii antitrombinice a plasmei* (AATP). La 0,1 ml

soluţie standardizată de trombină (cu timpul de coagulare de 10 secunde) se adaugă un volum egal de plasmă normală şi apă bidistilată. În condiţii fiziologice, valoarea acestui timp de trombina (TT, necesar pentru formarea cheagului) este de circa 25 de secunde. Paralel se măsoară TT în condiţii identice şi la plasma bolnavului. Valoarea acesteia se alungeşte proporţional cu activitatea factorilor antitrombinici prezenţi.

– *Determinarea toleranţei la heparină.* Paralel cu determinarea AATP se face şi o a doua probă, la care în loc de 0,1 ml apă distilată se adaugă 0,1 ml soluţie apoasă de albastru de toluidină 0,1 g %. Acest colorant formează un complex inactiv cu heparina, astfel ducând la scurtarea TT, în măsura cantităţii de heparină prezente în plasma de analizat.

– *Determinarea activităţii antitrombinice a serului* (AATS). Se amestecă volume egale de ser de analizat, soluţie de trombină standardizată şi ser fiziologic. Din acest amestec se scot fracţiuni de câte 0,1 ml după 1, 5 şi 10 minute, care se adaugă la o plasmă normală cu TT cunoscut, în vederea declanşării coagulării. În cazul în care trombina adăugată a fost parţial inactivată de către factorii antitrombinici prezenţi în serul de bolnav, TT al plasme se va alungi proporţional.

D) **Explorarea de laborator a coagulopatiilor autoimune:**

Autoanticorpii inhibitori prezenţi în plasmă şi serul unor bolnavi cu boli autoimune neutralizează factorii sau cofactorii respectivi în mod ireversibil. Astfel timpul de recalcificare alungit la aceşti bolnavi nu poate fi corectat în *vitro* prin adăugarea unei plasme normale. Aceşti autoanticorpi prezenţi sub formă liberă sau fixaţi în complexe imune circulante în plasmă pot fi identificaţi cu ajutorul unor metode serologice, dar cel mai bine cu RIA sau ELISA. O formă deosebită a acestor inhibitori o constituie *anticoagulantul* sau *inhibitorul lupic*, îndreptat împotriva componentului fosfolipidic al complexului de activare a protrombinei.

E) **Explorarea de laborator a fibrino(geno)lizei:**

– *Compararea volumului cheagului format* la 1 şi la 24 de ore în urma recoltării sângelui. În condiţii fiziologice se descompune 10-20% din cheagul de fibrină.

– *Prin aprecierea oculară a cheagului* la 24 de ore în urma recoltării sângelui. În cazul unei fibrinolize excesive, cheagul prezintă marginile dinţate. Hematiile eliberate din cheagul lizat se depun în fundul eprubetei şi formează un sediment mobil, care se deplasează liber la mişcarea uşoară a eprubetei. În stări inflamatoare severe, viteza de sedimentare a hematiilor poate fi atât de mare, încât ele sedimentează în eprubetă înaintea începerii coagulării. Partea superioară a cheagului va fi astfel lipsită de hematii, deci va fi albă, din cauza prezenţei exclusive a fibrinei. Fenomenul a fost descris de Galen, ca un *semn rău al crestei inflamatoare* (*crusta phlogistica, signum mali ominis*).

– Punerea în evidenţă şi determinarea cantitativă în ser şi în urină a produşilor de degradare monomerică a fibrinogenului (FDP) şi dimerică a fibrinei (fdp).

5.5. Elementele figurate ale sângelui: hematopoieza normală și patologică

55% din volumul sanguin circulant este alcătuit din elemente figurate: hematii, granulocite, limfocite, monocite şi plachete.

5.5.1. Eritrocitele și hemoglobina

Sunt elemente anucleate, cu formă discoidă biconcavă, având diametrul de 7,5 μ, grosimea medie de 2,5 μ şi o suprafaţă medie de 130 μ^2. Luând în considerare faptul că numărul hematiilor este de 4-5 milioane/μl, suprafaţa totală a lor poate fi estimată între 3 500-3 800 m^2. Durata medie de viaţă în sângele circulant a hematiilor este de 120 de zile.

Compoziţia chimică a hematiilor

Hematiile conţin 60% apă (40% *liberă*, 20% *legată de diferite structuri*) şi 40% substanţe solide, din care 37% sunt reprezentate de hemoglobină şi restul de proteine structurale (stromatină) şi enzime. Conţinutul ionic al hematiilor constă din următorii electroliţi: K^+ = 125 mmol/l, Na^+ = 20 mmol/l, Ca^{++} = 0,5 mmol/l, Mg^{++} = 2,1 mmol/l, Cl^- = 55 mmol/l, HCO_3^- = 15 mmol/l.

Printre componenţii organici macromoleculari ai hematiilor predomină *hemoglobina*. Din cantitatea totală de 160 g/l a hemoglobinei din sânge, conţinutul în hemoglobină a unei hematii se situează între 26-31 μg.

Componenţii organici nehemoglobinici ai hematiilor sunt atât de origine plasmatică, colesterolul liber (neesterificat), cât şi proprii: nucleotizi, aminoacizi, fosfolipide, glucide, glutation (0,3 g/l), 2,3-difosfoglicerat, coenzime, enzime ale glicolizei cu activitate slabă (hexokinază, aldolază, fosfofructokinază), cu activitate medie (fosfohexoizomeraza, fosfoglucomutaza, enolaza, piruvatkinaza) şi cu activitate puternică (triozofosfatizomeraza, glicerinaldehidfosfatdehidrogenaza, fosfogliceratkinaza, acetilcolineteraza, fosfataza alcalină, catalaza, anhidraza carbonică şi glucozo-6-fosfatdehidrogenaza). Carboanhidraza are un rol substanţial în transportul prin sânge al bioxidului de carbon, dar şi în menţinerea echilibrului acidobazic în organism. Enzima există sub 3 forme de izoenzime: A, B şi C, din care predomină forma B. Glucozo-6-fosfatdehidrogenaza lucrează cu coenzima NADP şi asigură retransformarea neîntreruptă prin reducţie a hemiglobinei (methemoglobinei) în hemoglobină.

Structura hematiilor

Membrana eritrocitară are structura corespunzătoare membranelor biologice lipidice bistratificate. Pe suprafaţa externă a membranei sunt exprimaţi o serie de markeri glicoproteinici, conţinând în poziţie terminală

acidul neuraminic, inclusiv determinanţii grupelor sanguine, cu excepţia markerilor complexului major de histocompatibilitate (HLA, MHC). Elasticitatea membranei este asigurată de *spectrină*, o glicoproteină contractilă, situată pe suprafaţa internă. O altă glicoproteină integrală, cu capătul N-terminal spre exterior şi cel C-terminal spre interior, numită *glicoforina*, realizează transportul anionilor (HCO_3^-, Cl^-). Enzima *ATP-aza Na^+/K^+-dependentă* este orientată spre interior şi realizează schimburile ionice active între K^+ şi Na^+, în sensul menţinerii gradientului de K^+ în hematii.

Stroma hematiilor este formată de o reţea tridimensională multiramificată, alcătuită din monomerii unei glicoproteine numită *reticulină*, cuplaţi între ei sub forma unor fibre solide multiramificate. Spaţiile interfibrilare conţin *sistemul canalicular* citoplasmatic al hematiilor, corespunzător reticulului endoplasmatic, cu pereţii din membrane lipidice.

În *citozol* este localizată hemoglobina, dar şi enzimele metabolismului globular (glicoliza şi shuntul pentozofosfatic).

Metabolismul eritrocitar

Acesta este caracterizat printr-un consum redus de oxigen (5 μl/h/ml) din cauza lipsei mitocondriilor, respectiv a lipsei lanţului respirator localizat în ele. Astfel, în hematii predomină glicoliza anaerobă (90%), însoţită de oxidarea directă a glucozei, prin shuntul pentozofosfatic (10%). Energia eliberată în cursul acestor lanţuri metabolice este folosită pentru următoarele scopuri: menţinerea structurii şi forme normale a hematiilor; păstrarea hemoglobinei în starea funcţională normală, feroasă, prin retransformarea continuă a methemoglobinei ferice (hemiglobinei) în hemoglobină redusă; menţinerea gradientului de K^+ şi al echilibrului ionic al hematiilor; menţinerea compoziţiei în substanţe organice a hematiilor.

Menţinerea formei discoidale a hematiilor este asigurată de integritatea morfofuncţională a membranei, condiţionată de rezervele de ATP, produse de metabolismul hematiilor. Din cauza lipsei glicogenului depozitat, hematiile îşi acoperă necesităţile lor în carburanţi, exclusiv prin folosirea glucozei din sânge. Scăderea cu 50% a rezervelor energetice a hematiilor, fie din cauza cantităţii insuficiente a glucozei, fie din cauza manifestării unor tulburări metabolice, duce la formarea *sferocitelor*.

Păstrarea hemoglobinei hematiilor în stare funcţională normală, feroasă, este realizată de enzima *methemoglobin-reductază* (având coenzima NADH) şi *glucozo-6-fosfatdehidrogenaza* (cu coenzima NADPH). În condiţii fiziologice, o cantitate de sub 1% din hemoglobină se găseşte sub formă de *hemiglobină* (*methemoglobină*) cu fierul trivalent (Fe^{+++}). Enzimele mai susamintite retransformă hemiglobina cu fier trivalent prin reducţie în hemoglobină cu fier bivalent. Albastrul de metilen dizolvat în apă, ca donator de hidrogen, stimulează această reducere atât în *vitro* cât şi în *vivo*.

Echilibrul ionic şi gradientul de K^+ intraglobular se menţine printr-un consum continuu de energie, asigurat de producţia continuă de ATP de către metabolismul hematiilor intact. În urma epuizării rezervelor de glucoză din

sânge, de ex. în cursul depozitării sângelui recoltat, gradienţii ionici dispar, echilibrându-se prin difuziune pasivă.

Componenţii organici macromoleculari, proteinici, ai hematiilor se formează în cursul eritropoiezei şi rămân incluşi în ele, în tot cursul duratei lor de viaţă de 120 de zile. Astfel, păstrarea lor în interiorul hematiilor este condiţionată de integritatea structurală şi funcţională a acestora.

Principalul component macromolecular al hematiilor este hemoglobina, care formează 2/3 din masa totală a hematiilor. Aceasta este o cromoproteină tetramerică, cu masa moleculară de 68 000 d, alcătuită din câte 2 perechi de peptide (α şi β), care are câte o grupare heminică fiecare (protoporfirina-IX, ce conţine fier bivalent) fiecare. În hematii, hemoglobina are următoarele funcţii: transportă oxigenul molecular, fixat în plămâni; participă la transportul prin sânge a bioxidului de carbon; participă la menţinerea echilibrului acido-bazic, realizând 20 mmol/l din cantitatea totală de 46 mmol/l a bazei tampon (BB) a sângelui.

Structura hemoglobinei

Molecula hemoglobinei este aproape sferică, cu diametrul de 5,5 nm (455 Å), formată din două perechi de peptide identice, α şi β, având fiecare câte o structură tetrapirolică liniară, cu un atom de fier bivalent, numită hem. Structura unui monomer corespunde structurii *mioglobinei* din muşchii scheletici şi din miocard. În molecula hemoglobinei aceste peptide se aranjează tetraedric, cu orientarea grupărilor heminice spre exterior. Formula moleculei este deci α_2 / β_2. Atomii de fier (Fe^{++}) din hemine se găsesc la o distanţă medie de 2,5 nm (25 Å) între ei. Fiecare peptid α este în contact cu ambele peptide β. În schimb, există puţine contacte directe între lanţurile identice (α şi β). Peptidele α conţin 141 de aminoacizi şi sunt prezente în toate tipurile de hemoglobină. Peptidele β şi γ sunt alcătuite din 146 de aminoacizi, structurile lor deosebindu-se între ele numai prin deosebirea a câte unui aminoacid constituent. Structura de mai sus corespunde *hemoglobinei de adult*: $HgbA_1$ (α_2 / β_2). Varianta fiziologică a acestui tip, $HgbA_2$, reprezintă 2% din cantitatea HgbA totală şi are compoziţia peptidică de α_2 / δ_2. Hemoglobina fetală, desemnată HgbF, are compoziţia de α_2 / γ_2 şi apare în megalocite în cursul vieţii embrionare.

Biosinteza scheletului porfirinic începe în mitocondrii, cu condensarea glicinei şi a succinil-Coenzimei A în acidul δ-*aminolevulinic*, sub acţiunea enzimei *aminolevulinat-sintetază*. Produsul este excretat în citozol, unde *porfobilinogen-sintetaza* îl transformă în *porfobilinogen*. Enzima *porfobilinogen-dezaminaza* cuplează 4 molecule de porfobilinogen într-o structură liniară de pre-uroporfirinogen, care se ciclizează spontan în *uroporfirinogen-I*. Sub acţiunea enzimei ciclizante *costinază* (*uroporfirinogen-III-sintetaza*) se formează *uroporfirinogen-III*, care, în faza următoare este decarboxilată de către *uroporfirinogen-decarboxilază* în *coproporfirinogen-III*. O mică parte a substanţei este transformată prin dehidrogenare în coproporfirină-III, excretată prin scaun (1 mg/zi) şi urină (0,1 mg/zi). În condiţii fiziologice, ca produs secundar, se produc şi cantităţi mici de *uroporfirină-I*.

Pentru biosinteza protoporfirinei, coproporfirinogen-III trebuie să reintre în mitocondrii. Enzima coproporfirin-oxidaza transformă grupările etil din poziţiile 2 şi 4 în cele de vinil, apoi enzima protoporfirinogen-oxidaza, în urma dehidrogenării a două grupări iminopirolice, realizează structura definitivă a protoporfirinei (corespunzătoare izomerului 9 al substanţei protoporfirină-IX). În sfârşit, ferochelataza introduce un fier bivalent în moleculă, transformând-o astfel în *hem*. Hemul format este eliminat din mitocondrii în citozol, unde este cuprins în hemoglobină, respectiv mioglobină şi citocromi. În condiţii fiziologice zilnic se produc circa 300 mg hem.

Tulburările înnăscute sau dobândite ale biosintezei heminice duc la manifestarea *porfiriilor*, adică la acumularea mai mult sau mai puţin pronunţată în organism a porfirinelor, porfirinogenelor şi a precursorilor acestora. *Porfiriile primitive* apar din cauza unor enzimopatii înnăscute. *Porfiriile secundare* pot fi cauzate de leziuni hepatice grave, acidoză diabetică sau intoxicaţii (chiar şi cu medicamente). Formele principale ale porfiriilor sunt prezentate în tabelul 31.

Tabelul 31

Formele principale ale porfiriilor

Denumirea formei	Defecţiune biochimică	Moştenire	Excreţie sporită urină	fecale	fotosensibilitate
I. Eritropoietice:					
1. Porfiria eritropoietică, Günther	cosintaza	autozomal recesiv	URO-I	COPRO	+++
2. Protoporfiria eritropoietică	ferochelataza	autozomal dominant	-	PROTO	++
II. Hepatice:					
1. Porfiria acută intermitentă	preuroporfirinogen-sintetază	autozomal dominant	Ala, Pbg		--
2. Porfiria variegata g	protoporfirinogen-oxidază	autozomal dominant	URO, Ala, Pbg	COPRO PROTO	+/-
3. Coproporfiria ereditară g	coproporfirinogen-oxidază	autozomal dominant	Ala, Pbg	COPRO-III	+/-
4. Porfiria cutanea tarda -	uroporfobilinogen-decarboxilază	autozomal dominant sau toxic	URO	COPRO	+

Secvenţa aminoacizilor din mioglobină şi din peptidele globinice a fost determinată de Perutz, cu ajutorul metodei cromatografice a *amprentelor* (*finger print*). S-a constatat, că fragmentele cu molecularitate mai redusă, obţinute în urma degradării proteolitice parţiale a globinei şi separate prin cromatografie bidimensională, prezintă o localizare caracteristică pe cromatogramă. Orice modificare în compoziţia aminoacidică a globinei, chiar şi în privinţa unui singur fel de aminoacid, produce o modificare caracteristică

a fragmentului afectat. Cu ajutorul acestei metode s-a reuşit identificarea modificărilor compoziţiei aminoacizilor şi localizarea acestora în molecula globinei în cazul hemoglobinelor patologice cunoscute în prezent (de ex. HbS).

Structura tridimensională a peptidelor, precum şi a moleculelor de hemoglobină, a fost descoperită cu ajutorul radiocristalografiei de Perutz (1959). S-a demonstrat că aceste structuri sunt foarte apropiate în cazul mioglobinei şi al peptidelor din hemoglobină. În molecula fiecărui peptid se găsesc în total 8 porţiuni cu *structură helicoidală*, desenate de la A până la H, precum şi 5 segmente cu *secvenţă lineară*, pliată, desemnate de la AB până la GH. Se evidenţiază 2 aminoacizi, NA_1 şi NA_2, situaţi linear, aminoterminal, precum şi o porţiune longitudinală C-terminală, care conţine 5 aminoacizi (de la HC_1 până la HC_5).

Compoziţia aminoacidică a hemoglobinelor din diferite specii de animale este deosebită. Totuşi, există poziţii aminoacidice identice pentru toate speciile vertebratelor. Aceste poziţii identice, împreună cu rolul lor funcţional, sunt prezentate în tabelul 32.

Tabelul 32

Poziţiile aminoacidice identice în structura globinelor din diferite specii şi rolul lor funcţional

Poziţia	Aminoacidul	Rolul funcţional
F_8	histidină *his*	proximală, cuplată cu hem
E_7	histidină *his*	distal, apropiat de hem
CD_1	fenilalanină *fen*	contact cu hem
F_4	leucină *leu*	contact cu hem
B_7	glicină *gli*	apropierea helixurilor B şi E
C_2	prolină *pro*	închiderea helixului
HC_2	tirozină *tir*	cuplarea helixurilor H şi F
C_4	treonină *tre*	neelucidat
H_{10}	lizină *liz*	neelucidat

O caracteristică deosebită a globinei constă în aşezarea exclusivă a aminoacizilor polari pe suprafaţa moleculei. Aminoacizii apolari se situează în miez deoarece oxigenarea reversibilă a fierului din hem este posibilă numai într-un mediu apolar, lipsit de apă.

Deşi structura mioglobinei şi a celor 4 peptide din globină prezintă analogii structurale pronunţate, capacitatea funcţională în ansamblu a acestora din urmă este totuşi superioară sumei algebrice a capacităţii a 4 molecule de mioglobină. Această neconcordanţă aparentă poate fi explicată prin manifestarea unei *cooperări* între cei 4 constituenţi peptidici. La baza acestei cooperări a constituenţilor stă *caracterul alosteric* al hemoglobinei, care, însă, lipseşte din mioglobină. Din această cauză, fixarea primei molecule de oxigen de către prima grupare de hem facilitează fixarea următoarelor 3 molecule,

fenomen care nu se manifestă în cazul mioglobinei. Fixarea oxigenului de către hemoglobină se modifică în funcţie de aciditatea actuală şi de conţinutul în bioxid de carbon al mediului, factori care nu au influenţă asupra mioglobinei. Prezenţa 2,3-difosfogliceratului (2,3-DPG) reduce afinitatea hemoglobinei faţă de oxigen, dar nu modifică pe cea a mioglobinei.

Caracterul cooperant al fixării oxigenului de către hemoglobină devine evident în urma comparării proprietăţilor funcţionale ale hemoglobinei cu cele ale mioglobinei. Curba de disociere a oxigenului fixat de hemoglobină (curba de saturaţie a Hgb în funcţie de presiunea parţială a oxigenului, pO_2) este substanţial diferită de cea a mioglobinei. Mioglobina devine semisaturată cu oxigen ($\delta = 0,5$) la presiunea parţială de 1 torr, iar hemoglobina la 26 torri. Curba de saturaţie a mioglobinei este hiperbolică, iar cea a Hb sigmoidă, ceea ce exprimă natura cooperantă a fixării O_2 de către Hgb, prin interacţiunile celor 4 grupări heminice. Pe baza acestui caracter cooperant devine posibil pentru Hb să elibereze de două ori mai mult oxigen, decât în cazul în care cele 4 peptide ($2\ \alpha$ şi $2\ \beta$) ar funcţiona separat.

Efectul Bohr. Bohr a observat, în 1904, faptul că fixarea oxigenului molecular de către Hb nu este influenţată nici de valoarea acidităţii actuale (pH), nici de cantitatea de CO_2. În schimb, creşterea acidităţii actuale (scăderea valorii pH) şi creşterea presiunii parţiale a CO_2 (pCO_2) duc la reducerea afinităţii Hb faţă de oxigen, din care cauză eliberarea sa devine mai uşoară.

Barcroft (1921) a observat că afinitatea hemoglobinei reduse este semnificativ mai mare sub formă dizolvată, decât în interiorul hematiilor. Această diferenţă se explică prin prezenţa „unei substanţe" inhibitoare în hematii. Soţii Benesch au identificat această substanţă (1967) cu ajutorul 2,3-difosfogliceratului (2,3-DFG). S-a constatat că, în prezenţa 2,3-DFG, activitatea de a fixa oxigen a hemoglobinei reduse scade de 26 de ori. În absenţa 2,3-DFG, semisaturaţia cu oxigen a Hb apare la o presiune parţială caracteristică mioglobinei (1 torr), iar în prezenţa 2,3-DFG, urcă la 26 torri. 2,3-DFG se fixează în spaţiul liber situat între cele 4 peptide învecinate, deplasate uşor între ele în cursul oxigenării hemoglobinei. În cursul conservării (depozitării) sângelui 2,3-DFG se descompune. Din această cauză, sângele se coagulează mai uşor şi eliberează mai deficitar oxigenul. După o transfuzie obişnuită, cantitatea circulantă a 2,3-DFG în hematii se reface în 18-24 ore. În hipoxii (dar şi la altitudine) conţinutul în 2,3-DFG al hematiilor creşte, de la 4,5 mmol/l la 8 mmol/l.

Hemoglobina F (*Hb-F*) are o afinitate mai mare faţă de oxigen, decât cea a adultului. Această proprietate se datorează afinităţii reduse faţă de 2,3-DFG.

Proprietăţile alosterice ale hemoglobinei

Acestea se manifestă prin interacţiunile dintre cele patru peptide constituente ale hemoglobinei şi sunt legate de conformaţia tridimensională a moleculei. Peptidele izolate din hemoglobină pe plan funcţional se comportă în mod similar cu mioglobina, la fel ca şi tetramerii formaţi în *vitro* din 4 lanţuri peptidice β sau existenţi în varianta embrionară a HbF.

Fixarea oxigenului molecular modifică substanţial structura tridimensională a hemoglobinei. Haurowitz a observat, în 1937, că în urma contactului cu oxigenul cristalele de hemoglobină se sparg spontan. În condiţii identice, mioglobina şi HbH nu prezintă nici o modificare. Cu ajutorul radiocristalografiei s-a putut demonstra că structurile tridimensionale ale hemoglobinei şi oxihemoglobinei se deosebesc substanţial între ele. Molecula HbO_2 are o structură mult mai compactă, în care distanţa între cei 2 atomi de fier din peptidele β scade de la 3,99 nm la 3,34 nm. Printr-o rotaţie cu 15° a părţilor se modifică şi suprafaţa de contact între peptidele α şi β (α_1-β_1, α_2-β_2). Aceste suprafeţe se găsesc în apropierea hemurilor, influenţând puternic starea funcţională a acestora.

Structura dezoxihemoglobinei este stabilizată prin legături saline (ionice) intercatenare. Capătul C-terminal al peptidului α_1 reacţionează cu cel N-terminal al peptidului α_2. Porţiunea laterală argininică a capătului C-terminal este fixată de un rest aspartic din peptidul α_2. Capătul C-terminal al peptidului β_1 este legat cu lizina din porţiunea laterală a peptidului α_2. Restul imidazolic din capătul C-terminal al peptidului β_2 reacţionează cu un rest aspartic din partea laterală a aceluiaşi peptid. Toate aceste legături sunt necovalente, ionice. Din cauza existenţei lor, molecula dezoxihemoglobinei este mai restrânsă, corespunzând *formei alosterice T* (*tense*); în schimb, hemoglobina oxigenată are o structură moleculară mai laxă, corespunzătoare *formei alosterice R* (*relaxed*).

În momentul oxigenării hemoglobinei, atomul de fier, ieşind în evidenţă cu 0,06 nm din planul structurii lineare porfirinice, îşi ocupă poziţia anterioară prin alunecare, împreună cu histidina din peptidul F8, făcând astfel gruparea heminică mai accesibilă oxigenului. Aceste modificări structurale se propagă şi la alţi constituenţi, inducând o serie de modificări. De ex., expulzia tirozinei din HC_2, din „buzunarul" situat între helixurile F şi H, duce la desfacerea legăturilor saline intercatenare şi astfel la trecerea din forma T la cea R a moleculei.

Mecanismul fixării cooperante a oxigenului. În urma fixării primei molecule de oxigen, fixarea celor trei molecule următoare este facilitată de circa 300 de ori. Dezoxihemoglobina se află în stare tensionată T. Fixarea primei molecule de oxigen duce la desfacerea legăturilor ionice, prin care uşurează din ce în ce mai mult trecerea în forma R. 2,3-DPG reduce afinitatea hemoglobinei faţă de oxigenul molecular (facilitează eliberarea lui), prin realizarea unei legături încrucişate (*cross linking*) între cele 2 peptide β din molecula dezoxihemoglobinei, 2,3-DPG se localizează în centrul moleculei de hemoglobină, exact în domeniul în care cele 4 peptide sunt apropiate între ele. Fixarea 2,3-DPG în acest domeniu devine posibilă prin sarcinile pozitive ale grupărilor α-amino ale lizinei din EF6 şi ale histidinei din H21 din ambele peptide β. În momentul oxigenării hemoglobinei 2,3-DPG se elimină, deoarece din cauza deplasărilor intramoleculare cavitatea centrală devine prea îngustă. Acţiunea 2,3-DPG de a reduce afinitatea hemoglobinei faţă de oxigenul molecular constă în stabilizarea formei T a dezoxihemoglobinei,

prin legarea încrucişată a celor două peptide β. Fixarea bioxidului de carbon are loc la nivelul grupărilor amino în poziţie N-terminală, sub formă de *carbamaţi*: $R\text{-}HN\text{-}COO^- + H^+$. Carbamaţii stabilizează forma T şi astfel reduc afinitatea hemoglobinei faţă de oxigenul molecular.

Mecanismul biochimic al efectului Bohr. În locul fiecărui mol de O_2 pus în libertate din hemoglobina oxigenată, dezoxihemoglobina fixează 0,5 moli de H^+. Din această cauză sistemul Hb/HbO_2 funcţionează ca un tampon, având o capacitate de 20 mmol/l. Protonii sunt fixaţi de histidina 146 din cele două peptide β, dar şi de celelalte grupări aminice N-terminale. Este de remarcat că, sub acţiunea cianatului se formează *derivatul carbamoilat* al hemoglobinei, care nu poate fixa protoni. În urma eliberării oxigenului molecular, afinitatea faţă de protoni a histidinei 146 creşte, din cauza apropierii de ea a grupării carboxilice ionizate ($-COO^-$). Reiese că, fixarea moleculelor de oxigen, a protonilor, a bioxidului de carbon şi a 2,3-DPG sunt reacţii strâns cuplate între ele. Prezenţa sau absenţa separată sau în combinaţie a unuia sau altuia dintre aceşti factori produce modificări conformaţionale caracteristice ale structurii hemoglobinei. Ca o proteină alosterică prin excelenţă, hemoglobina nici nu dispune de proprietăţi stabile şi fixe, ci mai mult de unele variabile. Aceste proprietăţi se modifică în funcţie de natura semnalelor primite din mediul intern şi transmise în interiorul moleculei, ducând la manifestarea modificărilor structurale conformaţionale.

Hemoglobinele anormale

Hemoglobina izolată în urma hemolizei produse în *vitro* poate fi fracţionată cu ajutorul electroforezei zonale (gel de amidon, gel de poliacrilamidă). Alături de cele 3 variante fiziologice (HbA_1 şi HbA_2, HbF), la bolnavii cu diferite imunopatii cronice evolutive a fost identificat un număr însemnat de variante ale *hemoglobinelor patologice*. Aceste variante sunt desemnate cu literele mari ale alfabetului, precum şi cu numele oraşului, unde primul caz al anomaliei respective a fost identificat şi publicat. Deşi fiecare hemoglobină anormală corespunde unei mutaţii a unor alele solitare sau a unor perechi de alele (homo- sau heterozigote), marea majoritate a hemoglobinopatiilor ereditare rămân totuşi asimptomatice.

Prima hemoglobină anormală, transmisă ereditar, a fost descoperită de Herrick (1904) la un student de culoare, suferind de o boală ereditară cronică, hemoragică, numită *anemie drepanocitară (seceră, siccle cell)*. Linus Pauling a descoperit (1949) că hematiile sub *formă de seceră* se pot identifica numai în sângele venos, deoarece în cele 2 peptide β, *glutamina* este înlocuită de *valină*. De la *seceră* (*siccle*), această variantă a fost denumită de Pauling *hemoglobină S* (HbS). Valina, fiind un aminoacid apolar, reduce solubilitatea HbS, dar numai *sub formă dezoxigenată*. Ca urmare, în sângele venos, moleculele de HbS în hematii aderă între ele şi formează fibre lungi, helicoidale. În urma acestei precipitări a HbS hematiile se deformează în mod caracteristic şi apar ca drepanocite pe frotiul colorat. În aceste hematii deformate multiplicarea plasmodiului malariei este îngreunată. Se pare că selecţionarea naturală a mutantei HbS în cursul filogenezei a fost o reacţie

de apărare împotriva acestui parazit.

În Hb-Zürich, *histidina* 63 din peptidele β este schimbată cu *arginina*. Anomalia se transmite autozomal dominant, deci se manifestă şi la heterozigoţi. Totuşi, de obicei, modificarea rămâne asimptomatică. Însă, în urma consumării unor medicamente (sulfonamide, antimalarice) se manifestă o hemoliză intravasculară gravă. Hemoglobinopatii similare s-au descris şi în Ube (Hb-Ube-I), (HbKöln), Genova (Hb-Genova) etc. În aceste cazuri mutaţia se manifestă în schimbarea acelor aminoacizi (histidina 63) care protejează fierul bivalent împotriva oxidării la fier trivalent (hemoglobina, methemoglobina).

5.5.2. Grupele sanguine

A. **Sistemul ABO**

Acesta a fost descoperit de Karl Landsteiner (1901), prin identificarea pe suprafaţa exterioară a hematiilor a două feluri deosebite (A sau/şi B) de *izohemaglutininogene*, precum şi a izohemaglutininelor corespunzătoare α şi β în plasmă. Cele din urmă se fixează în mod specific pe izohemaglutininogenele corespunzătoare şi duc la aglutinarea hematiilor. Totuşi ele nu sunt anticorpi adevăraţi, seamănă mai degrabă cu *lectinele*, care reacţionează în mod similar cu unele glucide situate la capetele terminale ale unor glicoproteine.

Izohemaglutininele β sunt substanţe omogene, în schimb izohemaglutininele α din plasma persoanelor cu grupele 0 şi B sunt compuse din două porţiuni:

1. izohemaglutinina α-comun care aglutinează hematiile atât purtătoare de substanţă A_1, cât şi A_2, şi

2. izohemaglutinina α_1, care aglutinează exclusiv hematiile cu izohemaglutininogenul A_1. Substanţa A are în poziţie terminală *N-acetil galactozamina*, iar substanţa B, *galactoza*. Glicoproteina lipsită de aceşti determinanţi se numeşte substanţa H, are în poziţii terminale *fucoza* (metilpentoza) şi este caracteristică grupei 0. Prin îndepărtarea pe cale enzimatică (cu N-acetil-galactozidază, respectiv galactozidază) a determinanţilor glucidici de pe suprafaţa hematiilor, hematiile de grupele A, B şi AB pot fi transformate în cele de grupa 0.

În plasma persoanelor cu grupa sanguină A se găsesc aglutinine β, la persoanele cu grupa B, aglutinine α, la cele cu grupa AB plasma este lipsită de aglutinine (acceptori universali), iar hematiile la persoanele cu grupa 0 nu au aglutininogene (donatori universali), dar au ambele tipuri de aglutinine α şi β în plasmă. Grupele sanguine apar în populaţie cu următoarele frecvenţe: grupa A 41%, grupa B 16%, grupa 0 36%, grupa AB 7%.

Grupele sanguine se moştenesc legate de sex şi codominant (A, B), respectiv recesiv (0) a celor 3 perechi de alele: A, B şi 0 (H). Genele A şi B

controlează biosinteza citoplasmatică a enzimelor *N-acetil-galactozaminil-transferază* şi *galactozil-transferază*, care transferă pe substanţele A şi/sau B, în poziţie terminală, monozaharidul respectiv. Gena 0 comandă biosinteza *fucozil-transferazei*. Genomul celulelor germinative (ovulul, spermatoizii) conţine câte o alelă din aceste perechi, care în urma fecundaţiei se pot combina în următoarele perechi: AA, AB, A0, AB, BB, B0, A0, B0 şi 00. Alelele A şi B exprimă codominant, iar alela 0 este recesivă. Astfel, fenotipurile A şi B se pot exprima sub două forme: AA şi BB (homozigoţi), respectiv A0 şi B0 (heterozigoţi). Grupa 0 este totdeauna homozigotă (00), iar grupa AB este o formă heterozigotă, în care, însă, în mod codominant se exprimă caracterele ambelor alele A şi B.

Pe baza mecanismului transmiterii ereditare a grupelor sanguine AB0 se pot face următoarele constatări, importante şi din punct de vedere medico-legal: grupele A şi B nu pot apare la copii în cazul în care lipsesc la părinţi, însă ele pot să lipsească la copii, chiar şi în cazul în care apar la părinţi; grupa 0 poate să apară la copii, chiar dacă nu există la părinţi; părinţii cu grupa 0 nu pot avea copii cu grupa AB, iar părinţii cu grupa AB nu pot avea copii cu grupa 0.

Subgrupele grupei AB0. Pentru substanţa A se deosebesc 2 subgrupe: subgrupa A_1 (tare) şi A_2 (slab). Astfel, prin combinarea acestora cu alte alele pot fi deosebite fenotipurile următoare: A_1, A_2, A_1B şi A_2B. Importanţa practică a acestor combinaţii constă în faptul că grupa A_2B poate fi considerată în mod eronat drept B, iar grupa A_2 drept grupa 0.

Substanţa H este precursorul substanţelor AB0. Partea ei proteinică este identică cu a celorlalte substanţe de grup. Partea glucidică se formează printr-un proces posttranslaţional în interiorul canalelor *aparatului Golgi*. Enzima fucozil-transferaza, a cărei biosinteză este controlată de perechea de alele recesive 0, introduce molecule de fucoză în poziţiile terminale ale catenelor glucidice. În cazul lipsei alelelor codominante, care controlează formarea transferazelor N-acetil-galactozaminice şi/sau galactozidice, substanţa H rămâne neschimbată şi apare pe suprafaţa hematiilor ca markerul grupei 0. În prezenţa transferazelor respective se cuplează N-acetil-galactozamina şi/sau galactoza cu fucoză şi formează astfel markerii A, respectiv B. Perechea de alele A_2 exprimă caracterul A într-o măsură mult mai slabă.

Posibilităţi de izoimunizare între grupele sanguine deosebite apar rareori şi în cadrul sistemului AB0. De ex. în cazul în care o gravidă are grupa 0, iar fătul grupa A_1, aglutininele pot pătrunde diaplacentar din plasma mamei în făt şi pot aglutina hematiile fetale de grup A_1. Reacţii posttransfuzionale la persoanele cu grupa 0 sau B pot apare din cauza neomogenităţii izohemaglutininelor. Deoarece izohemaglutinina α-comun aglutinează pe A_1 şi A_2, dar izohemaglutinina α_1 numai hematiile de aceeaşi subgrupă, în urma unei transfuzii mai masive (2-4 flacoane) cu sânge de grupa 0, efectuată la un bolnav cu grupa A_2, nu este de aşteptat nici o reacţie adversă. Însă, în cazul în care acelaşi bolnav este transfuzat din nou după câteva zile cu sânge izogrup (dar A_1), poate să se producă un şoc hemolitic din următoarea cauză:

prin transfuzia precedentă cu sânge de grupa 0 s-a realizat un aport pasiv de izohemaglutinină α-comun şi α_1. Cea dintâi se fixează pe suprafaţa hematiilor A_2 şi a endoteliului vascular. Izohemaglutininele α_1, însă, fără izohemaglutininogenele corespunzătoare (A_1), circulă liber şi persistă în plasmă, chiar pentru mai multe zile. În cursul transfuziei cu sânge izogrup (A_1), aceste izohemaglutinine introduse pasiv în organismul bolnavului, reacţionează cu markerii hematiilor transfuzate A_1 şi duc la manifestarea şocului hemolitic. În cadrul *izohemaglutininogenilor B* se deosebesc următoarele subgrupe: Bw, Bx, B3 şi B slab.

Tipul secretor al grupelor sanguine. Substanţele de grup sanguin A, B şi 0 (H) pot fi exprimate şi pe suprafaţa altor celule, respectiv excretate în diferite secreţii (salivă). S-a constatat că 80% din populaţie este *secretoare*, restul de 20% *nesecretoare*. Manifestarea tipului secretor este determinat de o pereche de alele: *Se dominant* şi *Se recesiv*. Combinaţiile Se/Se (homozigot dominant) şi Se/se (heterozigot cu dominantă) corespund secretorilor, iar cea de se/se (homozigot recesiv) corespunde tipului nesecretor.

Mijloacele de prevenire a reacţiilor posttransfuzionale. Existenţa subgrupelor A şi B implică respectarea anumitor reguli fundamentale în determinarea grupelor sanguine AB0: prin folosirea serului 0, cuprinzând anticorpi adevăraţi anti-AB care reacţionează şi cu majoritatea subgrupelor A şi B, se poate evita stabilirea eronată a grupei 0 în cazul prezenţei markerilor slabi; paralel cu efectuarea *probei Beth-Vincent* (cu seruri anti-AB, anti-A şi anti-B) se recomandă şi efectuarea *probei Simonin*, pentru punerea în evidenţă a eventualelor *izoaglutinine* din plasmă (prin aceasta, poate fi evitată stabilirea eronată a grupei 0 în locul unor subgrupe A, sau considerarea greşită a grupei B în loc de A_2B).

B. **Sistemul Rh**

Prezenţa markerului Rh pe suprafaţa hematiilor a fost demonstrată de Karl Landsteiner şi Alexander Salomon Wiener (1940), constatând că antiserul de iepure, obţinut prin imunizarea animalelor cu hematiile maimuţei *Rhesus*, aglutinează şi hematiile umane la 85% din populaţie. Acest antigen eritrocitar comun a fost numit *factorul Rhesus* sau *factorul Rh*. Ca urmare, 85% din populaţie este *Rh-pozitivă* şi restul de 15% *Rh-negativă*.

Deşi descoperiţi de mult, încă nu s-a reuşit standardizarea denumirii factorilor şi a markerilor Rh. A.S. Wiener, pe baza faptului că fiecare alelă controlează apariţia a 3 determinanţi antigenici, desemnaţi de el, r, r', r", Ry, Ro, R1, R2 şi Rz, a postulat existenţa a *8 alele pleiotrope*. În schimb, Ronald Aymler Fisher şi Thomas Race au presupus existenţa a trei cupluri de gene, localizate (strâns legate între ele) în acelaşi cromozom somatic. Cele 6 feluri de alele din aceste haplotipuri sunt desemnate cu C, D, E dominante şi c, d, e recesive. Fiecare pereche de alele controlează biosinteza unui singur marker Rh. Aceste cupluri (haplotipuri) pot realiza 8 combinaţii posibile, localizate în cromozom: cde, Cde, cdE, CdE, cDe, cDE şi CDE. Perechea d recesivă (d/d) a alelei dominante D este ipotetică, deoarece produsul ei genetic nu a putut fi identificat. Pe plan ereditar, cuplul triplu al haplotipurilor se transmite

împreună. Fenotipul unui individ este deci determinat prin moştenirea a două cupluri de haplotipuri triple de la părinţi (câte un haplotip triplu de la fiecare). Manifestarea finală a fenotipului este deci identică, atât conform mecanismului propus de Wiener, cât şi a celui formulat de Fisher şi Race. Din cauza simplităţii şi a analogiei sale cu mecanismul transmiterii ereditare a haplotipurilor determinate ale sistemului major de histocompatibilitate (HLA, MHC) a fost acceptat modelul propus de Fisher şi Race.

Transmiterea ereditară a markerilor Rh. Cele 6 haplotipuri Rh se pot combina în trei perechi deosebite: Cc, Dd şi Ee. Haplotipurile dintr-o pereche prezintă următoarele particularităţi: caracterele haplotipurilor dintr-o pereche de alele (de ex. C şi c) sunt *antitetice*, ceea ce înseamnă că manifestarea unei alele dominante (C, D sau E) exclude manifestarea alelei recesive (c, d sau e); alelele din perechi se transmit separat sub formă de haplotipuri solitare, recombinându-se din nou în cursul restabilirii diploidiei (de ex. în perechea fenotipică de Cc, cele două haplotipuri C şi c provin separat din cei doi părinţi); pe suprafaţa hematiilor este prezent în mod obligatoriu cel puţin unul din produşii genetic ai alelelor individuale.

În urma combinaţiei libere a haplotipurilor triple (cde, Cde, cDe, CdE, cDe, CDe, cDE şi CDE) se pot forma mai multe perechi. Constituenţii antitetici şi alelomorfi ai acestora, reprezentând genotipul, coexistă în cromozomul somatic respectiv, iar produşii lor genetici pe suprafaţa hematiilor alcătuiesc fenotipul. Hematiile pot dispune pe suprafaţa lor de minimum 3 homozigoţi (ca CDE/CDE) şi maximum 6 heterozigoţi (ca cDE/Cde), haplotipuri diferite.

Antigenul Rh original este desemnat cu D (produsul genetic al perechii d este inexistent sau neantigenic) dispune de o imunogenitate de circa 50 de ori mai puternică decât celelalte (C şi E). „Prezenţa" (mai corect: *absenţa*) produsului genetic al alelei d pe suprafaţa hematiilor determină *Rh-negativitatea* acestora. O variantă mutantă, slabă, a haplotipului D este desemnată D_u, care poate fi cauza rezultatelor *Rh fals negative*.

Posibilităţile de izoimunizare anti-Rh. Spre deosebire de sistemul AB0, plasma normală nu conţine izohemaglutinine specifice anti-Rh. Anticorpii anti-Rh adevăraţi pot fi produşi însă în organism, în urma unor *izoimunizări* în următoarele situaţii: transfuzia sângelui *Rh* +, la o persoană *Rh* -; dezvoltarea unui *făt Th* +, la o *gravidă Rh* -; efectuarea unei grefe de ţesut sau de organ provenit de la un *donor Rh* -, la un *primitor Rh* +.

La o gravidă Rh-negativă, purtătoarea unui făt Rh +, se formează anticorpi anti-D (de obicei din clasa IgG, dar şi IgM), care pe cale transplacentară ajung în organismul fătului, se fixează de epitopii hematiilor fetale Rh-pozitive. În urma acestei reacţii antigen-anticorp se activează sistemul complement embrionar, hematiile afectate fiind distruse prin hemoliză. Ca urmare, fătul cu incompatibilitate Rh se naşte cu *boala hemolitică a nou-născutului*.

Mamele Rh-negative având grupa sanguină A, în comparaţie cu cele cu grupa 0, se sensibilizează mai uşor împotriva antigenului D. Frecvenţa cazurilor de incompatibilitate AB0 între mamă şi făt creşte pericolul sensibilizării anti-Rh. De remarcat că faţă de circa un milion de markeri A1 prezenţi pe suprafaţa

unei hematii, se găsesc numai circa 10-30 000 determinanţi D. Administrarea pasivă a anticorpilor specifici anti-D la femei Rh-negative suprimă formarea anticorpilor anti-D proprii. Pe această cale se poate preveni sensibilizarea anti-Rh în cursul sarcinii la o gravidă Rh-negativă şi purtătoare a unui făt Rh-pozitiv.

C. **Modificările numerice şi funcţionale ale hematiilor**

Hematiile, împreună cu celelalte elemente figurate, se formează în măduva roşie, dintr-un precursor celular comun tuturor celulelor sanguine: *hemohistioblastul*. Primul precursor specific al hematiilor este proeritroblastul, care încă nu conţine hemoglobina. Biosinteza pigmentului sanguin începe în *eritroblastul bazofil*, creşte în cel *policromatofil* şi domină în *eritroblastul ortocromatofil*. Hematiile se maturizează prin dispariţia nucleului, după care ele trec din măduvă în sângele circulant prin *eritrodiabază*. Unele hematii recent intrate în circulaţie, numite *reticulocite*, mai păstrează unele resturi ale nucleului sub forma unei reţele fine, bazofile, *numită substanţă reticulofilamentoasă*.

Eritropoieza normală este condiţionată de prezenţa cantităţilor suficiente de substanţe primare (aminoacizi, glucide); a enzimelor şi cofactorilor necesari (vitamine, fier, cupru), precum şi a unor factori de creştere (eritropoietina). Scăderea sau lipsa acestor factori reduce randamentul eritropoiezei şi duce la manifestarea unei *anemii*. În schimb, în urma creşterii excesive a formării hematiilor se manifestă o *poliglobulie*.

Pe baza naturii fazei tulburate (eritropoieza, biosinteza hemoglobinei, hemoliza) anemiile sunt clasificate în 3 grupe mari, prezentate în tabelul 33.

Tabelul 33

Clasificarea anemiilor

Nr.	Felul tulburării patologice	Baza patobiochimică a anemiei
1.	Anemiile din cauza tulburării eritropoiezei: anemia pernicioasă megaloblastică (boala Biermer), anemiile macroblastice, anemiile aplastice.	Carenţa de vitamina B12, carenţa acidului folic, substanţe toxice şi/sau imune, radiaţii.
2.	Anemiile din cauza formării deficitare a hemoglobinei: anemiile feriprive, anemiile sideroacrestice, atransferinemia ereditară.	Carenţa de fier, tulburări ale sintezei heminice (ale uroporfirinogen-decarboxilazei) şi ale biosintezei transferinei.
3.	Anemiile hemolitice: sferocitoza, enzimopatii eritrocitare, hemoglobinopatii (drepanocitoza, α-talasemia β-talasemia).	Defecţiune de membrană, tulburări enzimatice (glicoliza şi/sau ciclul pentozelor), hemoglobine patologice (HbS), scăderea sau lipsa formării peptidelor α sau β.

Enzimopatiile eritrocitare. Hipofuncţia sau absenţa ereditară a unei enzime din hematii se poate manifesta sub forme foarte variate, ca schimbarea afinităţii faţă de substrat sau faţă de cofactor, modificarea activării sau inhibiţiei alosterice, a proprietăţilor fizice etc. Se poate manifesta şi o degradare excesivă a enzimei. Defectele enzimatice ce duc la scurtarea duratei de viaţă a hematiilor se transmit autozomal recesiv şi afectează cel mai frecvent enzimele glicolizei (hexokinaza, hexozofosfatizomeraza, fosfofructokinaza, triozofosfatizomeraza, fosfogliceratkinaza, fosfogliceratmutaza, piruvatkinaza) şi/sau a ciclului pentozofosfatic (glucozo-6-fosfatdehidrogenaza, glutationreductaza, glutationsintetaza, glutationperoxidaza), dar uneori şi enzimele metabolismului acizilor nucleici (adenilatkinaza), ATP-aza Na^+, *K^+-dependentă*, pirimidin-5'-nucleotid-nucleozidaza).

Din punct de vedere semiologic, enzimopatiile eritrocitare diferite duc la manifestarea simptomelor similare, ca anemia hemolitică spontană sau provocată (nesferocitotică), de obicei fără splenomegalie. Oxidarea directă a glucozei prin shuntul pentozofosfatic este strâns legată de metabolismul glutationului în hematii. Reiese, că sub acţiunea enzimei *glucozo-6-fosfatdehidrogenaza* un atom de hidrogen este transferat de la molecula glucozei la $NADP^+$, ducând la formarea 6-fosfogluconolactonei şi a NADPH. Enzima *glutationreductaza* transformă glutationul oxidat (GS-SG) în cel redus (2 GSH), ce retransformă hemiglobina în hemoglobină prin reducere, dar are un efect protector important asupra oxidării altor grupări tiolice (-SH).

Dintre cazurile diferitelor hemoglobinopatii, prezentate sub titlul *hemoglobinele anormale*, prin modificarea proprietăţilor fizice şi/sau chimice ale ei, unele duc şi la scurtarea duratei de viaţă a hematiilor. În unele cazuri, aceste variante transmise ereditar se produc printr-o *mutaţie în punct* a genei sau a genelor de structură a hemoglobinei. În urma mutaţiei se schimbă un singur aminoacid în structura peptidului sau formarea lui devine insuficientă, chiar nulă. Hemoglobinopatiile ce duc la manifestarea anemiilor hemolitice sunt următoarele:

a) *Methemoglobinopatiile* prezintă mai multe variante, care se caracterizează prin formarea unor cantităţi excesive de methemoglobină (hemiglobina): HbM. Sistemul methemoglobinreductaza nu este capabil să reducă fierul trivalent în cel bivalent, din cauza faptului că restul de histidină, cuplat cu fierul bivalent, a fost schimbat cu un alt aminoacid, inapt pentru acest cuplaj. La heterozigoţi, alela dominantă asigură parţial biosinteza unor cantităţi de hemoglobină normală, la homozigoţii recesivi mutaţia este, însă, incompatibilă cu viaţa. În alte cazuri, în urma mutaţiei creşte labilitatea termică a hemoglobinei: la încălzirea sângelui în hematii se formează *corpusculi Heinz*, produşi de denaturare a hemoglobinei. Lipsa unui aminoacid din peptidele afectate produce tulburări şi mai grave.

b) *Anemia drepanocitară* a fost prezentată în cadrul hemoglobinelor anormale (HbS).

c) Talasemiile se caracterizează prin lipsa peptidelor α sau β; astfel se cunosc 2 tipuri deosebite: α şi β-talasemia. Forma homozigotă a α-talasemiei

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

este mortală, încă în cursul vieţii intrauterine, sub formă de *hidrops fetal*. Hematiile fetale conţin hemoglobină formată exclusiv din peptide δ (δ_4, Hb-Barts). Componentul principal al hematiilor heterozigote îl constituie HbA, alături de cantităţi variabile de Hb-Barts şi HbH, formată din 4 peptide β (β_4). Această formă corespunde *talasemiei minore*.

β-Talasemia nu este letală, nici sub formă homozigotă. Hb-A_1 absentă din cauza lipsei peptidelor β este compensată parţial prin formarea Hb-A_2 şi Hb-F, în urma creşterii biosintezei peptidelor α şi γ. Defecţiunea nu produce tulburări în cursul vieţii embrionare, deoarece în structura Hb-F nu sunt peptide β. *Talasemia majoră* este caracterizată prin lipsa totală a peptidelor β. La homozigoţi se manifestă o anemie severă, în urma unei hemolize excesive în splină. În forma numită *talasemia minoră* apărută la heterozigoţi, gradul hemolizei este mult mai mic, majoritatea bolnavilor sunt practic asimptomatici. Câte o variantă rar întâlnită a celor două forme a talasemiilor o constituie prezenţa în hematii a *Hb-Lepore*, care, alături de peptide, mai conţine şi peptide combinate din părţi de β şi α. Aceste combinaţii se formează prin schimburile încrucişate (*crossing over*) manifestate între alelele respective localizate în cromozomi diploizi. La bolnavi homozigoţi, din punct de vedere clinic, boala corespunde talasemiei majore, iar la heterozigoţi, talasemiei minore.

5.5.3. Leucocitele

Sub denumirea de *leucocite* sunt cuprinse toate elementele figurate *albe* lipsite de hemoglobină ale sângelui, care pot fi împărţite în 3 grupe principale: granulocite, monocite şi limfocite.

A. **Granulocitele**

Denumirea granulocitelor provine din granulele neutrofile (60%), eozinofile sau acidofile (3%) şi bazofile (sub 1%) prezente în citoplasma lor. Lizozomii granulocitelor se prezintă în frotiul colorat sub forma unor granule fine azurofile. Şi ele se formează în măduva roşie, din precursorul comun al tuturor elementelor figurate, numit *hemohistioblast*, prin trecerea peste fazele de mieloblast, promielocit, mielocit (neutrofil, eozinofil şi bazofil), metamielocit, granulocit nesegmentat şi segmentat matur. Nucleul segmentat al granulocitelor mature nu conţine nucleol(i), în citoplasma lor nu se găsesc nici ribozomi şi este mult redus şi numărul mitocondriilor.

Stimulate prin chemotactism, granulocitele se deplasează activ prin mişcări ameboide, pătrunzând din măduva roşie în circulaţie, respectiv din sânge în ţesuturi. Durata de viaţă a granulocitelor este de 9-13 zile, din care petrec numai câteva ore în circulaţie. Ca urmare, marea majoritate a granulocitelor se găsesc în măduva roşie, precum şi în organele şi ţesuturile periferice.

Metabolismul granulocitelor. Din cauza randamentului limitat al lanţului respirator, necesităţile energetice ale granulocitelor sunt acoperite în primul rând prin glicoliză şi shuntul pentozofosfatic. Majoritatea enzimelor granulocitare catabolizante sunt localizate în *lizozomi*, în interiorul cărora are loc distrugerea corpusculilor şi microbilor ingeraţi prin endocitoză.

Endocitoza este precedată de *chemotactismul* declanşat de o serie de *reactanţi ai fazei acute*, ca leucotrienele, factorii de complement C_{3a} şi C_{5a} (*anafilotoxinele*), lipopolizaharidele microbiene (endotoxinele), produşii de degradare ai fibrelor de colagen şi ai altor constituenţi celulari. Endocitoza unei particule (unui micorob) începe cu fixarea ei pe suprafaţa membranei granulocitului sau a monocitului (macrofagului). Această *endocitoză nespecifică*, manifestată în cursul primului contact al micro- şi macrofagelor cu particule de origine străină, are loc destul de lent. Însă în cazul unei presensibilizări anterioare, particulele se combină întâi cu *anticorpi specifici*, formând *complexe imune circulante*. Membranele micro- şi macrofagelor conţin structuri receptoare specifice pentru *porţiunile* F_c ale imunoglobulinelor, numite anterior *opsonine*, angajate în reacţiile de antigen-anticorp. Ca urmare, în comparaţie cu cea nespecifică, endocitoza specifică are un randament considerabil mai mare. S-a constatat că efectul stimulant al fagocitozei este localizat în secvenţă aminoacidică terminală (Tuftsin, obţinută şi pe cale sintetică în laboratorul de biochimie al Universităţii din Tufts, SUA) din lanţurile grele ale moleculei imunoglobulinelor.

Corpusculul fixat (nespecific sau specific) pe structurile receptoare ale membranei micro- şi macrofagelor este înconjurat de porţiuni de membrană. Înglobându-se în interiorul celulei, sub forma unui *corpuscul învelit* (*coated pit*), numit şi *fagozom*. Rezistenţa şi stabilitatea membranei este asigurată prin integrarea în structura ei a unor molecule proteinice, numite *clatrină*. Monomerii de clatrină formează în membrană structuri hexagonale, deosebit de rezistente faţă de acţiunile litice ale enzimelor. Fagozomul înglobat în citoplasmă, deplasându-se de-a lungul tubilor ergastoplasmei, face anastomoză cu câte un lizozom. În interiorul fagolizozomului format are loc descompunerea enzimatică a corpusculului înglobat (microbi, virusuri, complexe imune). Distrugerea intrafagolizozomială a microbilor se realizează prin mai multe mecanisme:

– Enzima *peroxidaza* transformă prin oxidare ionii de iodură (I^-) în iod molecular (I_2), care, fiind un puternic oxidant, distruge membranele celulare microbiene. Excesul intralizozomial al peroxidazelor este neutralizat de enzima superoxid-dismutaza (SOD), precum şi de unele substanţe lipidice *antioxidante* (vitamina A şi E);

– Enzimele oxidante ale shuntului pentozofosfatic şi ale oxidării glutationului au acţiuni similare;

– *Proteinele cationice* dăunează agresorilor prin producerea unor modificări structurale denaturante;

– Enzimele hidrolitice de origine lizozomială, inclusiv serinproteazele, nu numai că acţionează intrafagolizozomial, dar în urma eliberării lor spre exterior prin *degranulare*, descompun şi structurile proprii, activează prin proteoliză şi o serie de alte proenzime prezente. Enzima cu acţiune hidrolitică, numită *lizozim (muramidaza)* descompune acidul muraminic din glucozaminoglicanele membranelor unor microbi (*Bac, Lysodecticus*).

Tulburările numerice şi funcţionale ale granulocitelor. Scăderea numărului granulocitelor duce la leucocitopenii, inclusiv *agranulocitoza*. Leucocitoze sub

20 000 elemente/μl apar în cursul inflamaţiilor acute, creşteri de peste 100 000 elemente/μl în *leucemii granulocitare* acute şi cronice. Disfuncţiile granulocitelor pot fi ereditare sau dobândite. Disfuncţiile granulocitare înnăscute, ca *granulomatoza Wegener, sindromul Iob, sindromul Chediak-Higashi*, se manifestă în distrugerea deficitară sau nulă a microbilor endocitaţi. Tulburările funcţionale ale granulocitelor pot fi consecinţele unor serii întregi de stări patologice. La bolnavii cu diabet zaharat scade în mod caracteristic capacitatea de apărare nespecifică şi specifică a elementelor albe. În unele boli autoimune, ca *lupusul eritematos diseminat, poliartrita cronică evolutivă*, scade chemotactismul leucocitelor, capacitatea lor de endocitoză şi de distrugere a microbilor. Glucocorticoizii şi derivaţii lor sistemici prezintă efecte similare.

B. **Limfocitele**

Reprezintă 30-40% din elementele figurate albe circulante. În funcţie de originea lor timică (T) sau medulară (B=*Bone marrow*) au markeri deosebiţi şi sunt desemnate cu T (80%) şi B (20%). Limfocitele T_0 nu dispun de markeri. Ele reprezintă elementele T-limfocitare cu o durată de viaţă maximă (1-2 ani) (*Natural Killer*, NK) angajate în recunoaşterea şi uciderea celulelor proprii transformate malign. Limfocitele T_4h (CD_4) au funcţii *ajutătoare* (*helper*), cele T_8k (CD8) devin *supresoare* şi *citotoxice*, numite şi *ucigaşe* (*killer*), în urma unei sensibilizări specifice faţă de unele substanţe antigenice.

Scăderea sub forma unei limfopenii sau lipsa ereditară a limfocitelor se poate manifesta separat, ca o defecţiune B-limfocitară (agamaglobulinemie de tip elveţian, *Bruton*), respectiv T-limfocitară (sindromul *Di George*), sau combinate, grave (sindromul *Wiskott-Aldrich*). Limfopeniile dobândite de obicei sunt de origine virală (pojar, HIVD), medicamentoase (manifestate în urma unui tratament imunosupresor sau citostatic) sau sistemice (boala Hodgkin, Policitemia Vera, tuberculoza miliară, lupus eritematos diseminat, stări de uremie etc.).

Numărul limfocitelor creşte temporar în unele infecţii acute (mononucleoză, citomegalie, hepatite) şi cronice (bruceloză, tuberculoză). Creşterea marcantă a limfocitelor apare în diferite limfoame maligne (leucemii limfoide acute şi cronice, boala *Waldenström*, boala *Franklin* etc.).

C. **Monocitele, macrofagele**

Sunt elementele figurate cu dimensiunile cele mai mari, fiind prezente ca monocite într-o proporţie de 5% în sânge. Ca elemente mobile ajung şi în organe şi ţesuturi, ca în celulele Kupffer din ficat, macrofagele alveolare, celulele mezangiale intraglomerulare din rinichi, celulele Langerhans din ţesutul epitelial, celulele microgliale din sistemul nervos central, macrofagele periferice limfoide din plăcile lui *Peyer* etc. Ansamblul acestor celule mobile reprezintă *sistemul macrofag monocitar* (SMM), cu funcţii fundamentale în apărarea nespecifică şi specifică a organismului.

Principalele funcţii ale macrofagelor sunt: endocitoza şi pinocitoza nespecifică şi specifică, mediată de receptori F_c, C_3 şi de transferină; prelucrarea şi prezentarea structurilor antigenice specifice; formarea, depozitarea şi secreţia unor mediatori cu activităţi biologice variate (*prostaglandine, interleukine*).

6 Modificările funcționale ale sistemului imun de apărare

6.1. Noţiunea de antigen 403
6.1.1. Markerii celulari ai individualităţii biologice. Sistemul major de histocompatibilitate 403
6.1.2. Receptorii B-limfocitari: imunoglobulinele 405
6.1.3. Receptorul T-limfocitar 408
6.2. Apărarea nespecifică a organismului 409
6.2.1. Apărarea nespecifică celulară-tisulară 409
6.2.2. Apărarea nespecifică umorală 410
6.3. Răspunsul imun primar şi secundar 413
6.3.1. Răspunsul imun primar 413
6.3.2. Răspunsul imun secundar 415
6.4. Apărarea specifică a organismului 416
6.5. Tulburările înnăscute şi dobândite ale imunităţii 416
6.5.1. Tulburările ereditare ale endocitozei 417
6.5.2. Tulburările dobândite ale endocitozei 418
6.5.3. Deficienţa ereditară a factorilor properdinici şi de complement 418
6.5.4. Stări imunodeficitare ereditare legate de limfocitele B 418
6.5.5. Tulburările ereditare ale imunităţii din cauza absenţei sau disfuncţiei limfocitelor T 419
6.5.6. Tulburările ereditare combinate ale limfocitelor B şi T 420
6.5.7. Tulburările dobândite ale apărării imune 420
6.6. Imunitatea antitumorală 423
6.7. Imunomodularea 425
6.7.1. Imunostimularea 425
6.7.2. Imunosupresarea 426
6.8. Reacţiile imune patologice 428
6.8.1. Reacţia imună patologică de tipul I (alergic, anafilactic sau atopic) 430
6.8.2. Reacţia imună patologică de tipul II, citotoxic 433
6.8.3. Reacţia imună patologică de tipul III (Arthus), prin complexe imune circulante 435
6.8.4. Reacţia imună de tipul IV (hiperegia T-limfocitară) 437
6.8.5. Toleranţa imună 437
6.9. Explorarea de laborator a apărării nespecifice şi specifice, celulare şi umorale 439

6.1. Noțiunea de antigen

Markerii elementelor celulare, pătrunse într-un organism deosebit (gazda), produc manifestarea unui *răspuns specific (imun) de apărare*, deci se comportă ca *antigene*. Pentru aceasta antigenul trebuie să aibă o masă moleculară minimă de 5 000 d, în care trebuie să fie localizată cel puțin o structură specifică, numită *epitop*, care determină specificitatea imună a antigenului. Epitopul solitar, fără de un purtător macromolecular se numește *haptenă*. *Caracterul de antigen*, adică prezența în macromoleculă a epitopului (epitopilor), nu înseamnă însă în toate cazurile și *imunogenicitate*, adică capacitatea de declanșare a unui răspuns imun. În sfârșit, pătrunderea într-un organism a unui antigen în cantități excesive poate să producă *paralizia sistemului imun de apărare*, ducând la manifestarea unei *imunotoleranțe*. Pe baza acestor considerente, proprietățile generale structurale și biologice ale antigenelor pot fi caracterizate în felul următor: *structura macromoleculară; antigenicitatea*: prezența în macromolecule a porțiunilor determinante specifice, *epitopi*; *imunogenicitatea*: capacitatea de a induce într-un organism sensibil un răspuns imun specific celular și umoral; *imunotoleranța prin imunoparalizie* în urma pătrunderii în organism a unor cantități excesive de antigen.

6.1.1. Markerii celulari ai individualității biologice.

Sistemul major de histocompatibilitate

Aceste structuri specifice au fost descoperite întâi pe suprafața leucocitelor de Henry Dauset, din care cauză au fost numite *antigenele leucocitare umane* (*Human Leukocyte Antigens*. HLA, A, B și C). Dat fiind că acești markeri sunt exprimați (cu excepția hematiilor și a celulelor germinative) pe suprafața tuturor celulelor somatice, au fost numiți *HLA de clasa I*. Prezența unor markeri similari pe celulele somatice (H1) și imune (H2) ale rozătoarelor a fost pusă în evidență de George Snell, iar pe imunocitele umane (HLA-DP,Q și R) de Baruj Benacerraf, numite *HLA de clasa a II-a*. Pentru această descoperire fundamentală cei trei cercetători au fost laureați cu premiul Nobel pentru medicină (1980).

S-a constatat, că genele de structură, care comandă biosinteza citoplasmatică a markerilor HLA, sunt localizate în brațul scurt al cromozomului 6, în apropierea genelor care controlează biosinteza factorilor C2, C4 de complement și a factorului B properdinic. Haplotipurile din perechile respective sunt codominante și prezintă o variabilitate deosebit de mare. Pentru haplotipul HLA-A au fost identificate până în prezent 18 variante, pentru

HLA-B 40, pentru HLA-C 12, pentru HLA-D 20 de variante, din care 10 pentru haplotipul HLA-DP, 4 pentru HLA-DQ, şi 6 pentru HLA-DR. Factorialele (produsele cifrice: 1 x 2 x 3...x n) acestor variante individuale asigură formarea mai multor miliarde de combinaţii alelice în perechi; astfel, cu excepţia gemenilor univitelini, ai căror haplotipuri sunt identice, fiecare individ de pe glob dispune de o combinaţie haplotipică individuală unică şi proprie. Pe baza prezenţei ubicuitare într-un organism a markerilor HLA, la propunerea OMS, ansamblul lor a fost numit *sistemul major de histocompatibilitate* (*Major Histocompatibility Complex, MHC*).

Structura haplotipurilor de histocompatibilitate. Markerii MHC sunt proteine sau glicoproteine dimere, formate din câte un lanţ peptidic greu şi unul uşor. Lanţurile grele (H) ale antigenelor HLA-A, B şi C au masa moleculară de 44 000 d şi sunt fixate prin capetele lor C-terminale în membranele celulelor somatice. Lanţurile H, numite $ß_1$-microglobulină, cu masa moleculară de 11 000 d sunt fixate numai la un singur punct de cele H. Astfel se pot elibera uşor şi se excretă rapid prin urină. Prezenţa lor în urină semnalizează o leziune tisulară gravă (creştere tumorală, respingere de grefă). Gena de structura a $ß_1$-microglobulinei este localizată în cromozomul 15.

Substanţele HLA-D (P, Q şi R) se numesc antigenele de histocompatibilitate de clasa a II-a şi se găsesc exclusiv pe suprafaţa imunocitelor. Sunt glicoproteine dimere, lanţul greu H are masa moleculară de 34 000 d, iar cel uşor H, de 28 000 d. Ele funcţionează ca *receptori pentru stimuli antigenici*, pe care îi transmit spre genomul celulei.

Produşii MHC de clasa a II-a sunt reprezentaţi de factorii C2 şi C4 de complement, şi de factorul B al properdinei. În realitate nu sunt echivalenţi cu cei adevăraţi din clasele I şi II, deoarece nu prezintă variaţii individuale, nu sunt fixaţi pe suprafaţa celulelor, ci circulă liber în plasmă. Au fost cuprinşi în categoria markerilor MHC, din cauza situării comune în acelaşi cromozom 6 al genelor lor structurale cu cele ale markerilor adevăraţi.

Transmiterea ereditară a haplotipurilor sistemului MHC. Haplotipurile părinţilor se transmit în descendenţi în mod autozomal şi codominant. Aceasta înseamnă că pe de o parte perechile alelelor sunt totdeauna heterozigoţi, pe de altă parte fiecare alelă individuală dintr-o pereche îşi manifestă funcţia proprie. Ca urmare, în cazul celor 3 haplotipuri din clasa I (HLA-A, B şi C), pe suprafaţa celulelor purtătoare a acestor markeri se găsesc de fapt 6 determinanţi deosebiţi, 3 de la mamă şi alţi 3 de la tată. Dintr-un triplet al perechilor de haplotipuri A, B şi C se transmite de la fiecare părinte numai un singur triplet de haplotipuri. Astfel, la descendenţi devin posibile următoarele combinaţii:

Maternal:		Paternal:	
A1/A2		A3/A4	
C5/C6		C7/C8	
B9/B10		B11/B12	
a/b		c/d	
Descendenți:			
1	2	3	4
a/c	a/d	b/c	b/d

Reacția gazdă împotriva grefei (*Host Versus Graft Reaction, HVGR*) constă în respingerea prin distrugere a țesutului sau organului grefat și se manifestă prin sensibilizarea limfocitelor CD_8k împotriva markerilor SMHC de clasa I a celulelor acestora. *Reacția grefă împotriva gazdei* (*Graft Versus Host Reaction, GVHR*) se manifestă într-un organism imunosuprimat, lipsit de apărare, în urma sensibilizării imunocitelor din țesutul sau organul grefat, împotriva antigenelor SMHC ale celulelor gazdei. Odată declanșată, GVHR nu mai poate fi oprită și duce în mod inevitabil la distrugerea totală a organismului primitor.

Deși antigenele SMHC au fost descoperite prin cercetarea histocompatibilității leucocitelor străine transfuzate, respectiv al țesuturilor și organelor grefate, rolul funcțional de bază al acestor structuri individuale îl constituie participarea lor directă în reacțiile imune antimicrobiene, antivirale, antitumorale și antiparazitare.

6.1.2. Receptorii B-limfocitari: imunoglobulinele (vezi 5.4.6)

Limfocitele B de origine medulară dispun pe suprafața lor de molecule de imunoglobuline (Ig) de diferite clase, ancorate în membrană cu capetele lor peptidice C-terminale. Totuși, imunoglobulinele plasmatice nu provin din eliberarea acestor molecule, ci sunt sintetizate în plasmocitele derivate din limfocitele B.

Structura imunoglobulinelor

Imunoglobulinele sunt compuși proteinici tetrameri, formați din câte o pereche de lanț peptidic greu (*heavy*, H) și ușor (*light*, L), cu masele moleculare de 44-66 000 d, respectiv 22 000 d, conținând un număr de 200, respectiv 300-340 de aminoacizi. Lanțurile sunt cuplate între ele disulfidic, în așa fel încât cele două porțiuni N-terminale sunt îndepărtate între ele sub formă de Y. Punctul de despărțire a furcii este mobil, sub formă de *balama* (*hinge*), permițând celor două ramuri o mobilitate unghiulară considerabilă. Prin porțiunile lor cu structura specifică epitopului antigenic, numită *paratop*, cele două capete N-terminale bifurcate ale moleculelor Ig fixează antigenul și sunt desemnate ca fragmente Fab (*antigen binding*). Porțiunea C-terminală

a moleculei Ig poate fixa factorul $C1_q$ al complementului, sub formă izolată, poate fi şi cristalizată. Din acest motiv a fost desemnată ca fragmentul Fc (c provine de la complement, respectiv cristalizabil). Structura secundară a lanţurilor uşoare şi grele prezintă bucle, numte domenii (*domain*), formate din câte 100 de resturi aminoacidice, fixate între ele prin punţi disulfidice. Datorită marii variabilităţi a structurilor epitopilor antigenici, secvenţa aminoacizilor din cele două domenii N-terminale ale lanţurilor L şi H este deosebit de variabilă, dar foarte constantă în restul domeniilor. Ca urmare, fiecare lanţ uşor şi greu are câte un domeniu N-terminal cu secvenţă variabilă (Lv, Hv) şi unul cu secvenţă constantă (Lc, Hc1). Părţile N-terminale, formate din ultimele 10 resturi de aminoacizi, reprezintă *porţiunea hipervariabilă*, care formează cavitatea numită *buzunar* (*pocket*), în care se fixează epitopul antigenic. Această porţiune terminală comună reprezintă, deci, *regiunea determinantă a complementarităţii* anticorpilor (*Complementarity Determining Region*, CDR). Între cele două domenii se situează şi o porţiune de joncţiune, denumită J, formată din 4-6 resturi de aminoacizi, iar în cazul lanţurilor H încă o porţiune numită D (*de diversitate, diversity*), cuprinzând 8-10 resturi de aminoacizi.

În restul domeniilor (HC_2 şi HC_3 la IgA şi HC_4) secvenţa aminoacizilor este constantă. Catenele glucidice laterale sunt fixate pe resturi de acid aspartic sau glutamic, exclusiv din lanţurile H. Lanţurile L nu conţin glucide.

Clasificarea imunoglobulinelor

Pe baza secvenţelor aminoacidice deosebite (markerilor) prezente în domeniile cu secvenţă constantă, dar şi variabilă ale lanţurilor L şi H, pot fi deosebite mai multe grupe: izotipuri, alotipuri şi idiotipuri.

a) *Lanţurile L* au numai două izotipuri: k sau λ . În molecula unei Ig poate fi prezent numai un singur izotip.

b) *Lanţurile H* pot exista sub forma a 5 izotipuri: G, A, M, D şi E. Markerii acestora sunt localizaţi în domeniile cu secvenţa aminoacidică constantă şi participă la formarea Ig din clasele IgG, IgA, IgM, IgD şi IgE.

c) Fiecare *izotip* are şi *alotipuri*, prezente în Ig ale aceleeaşi clase ale unei populaţii. Astfel, clasa IgG poate avea 4 alotipuri: IgG_1, IgG_2, IgG_3 şi IgG_4: cele 2 alotipuri ale clasei IgA sunt IgA_1 şi IgA_2. Clasa IgM are tot 2 alotipuri: IgM_1 şi IgM_2. Izotipurile IgD şi IgE încă nu au fost identificate.

dd) *Idiotipurile* sunt variantele individuale (idiospecifice) ale claselor Ig, caracterizate prin markeri localizaţi în domeniile cu secvenţă aminoacidică variabilă ale lanţurilor Lv şi Hv. În condiţii fiziologice ele sunt mascate (cuprinse în adâncul structurii terţiare a lanţului peptidic). În cursul reacţiei antigen-anticorp, însă, ele se pot descoperi şi participă activ la reglarea răspunsului imun umoral (provocând formarea anticorpilor antiidiotipici sau a *anti-anticorpilor*).

Reglarea genetică a biosintezei imunoglobulinelor

Numărul infinit de mare al structurilor antigenice imunogene solicită existenţa unui număr corespunzător de gene reglatoare ale biosintezei anticorpilor specifici. Din cauza spaţiului nuclear limitat al imunocitelor,

această condiţie nu poate fi nicidecum realizată. Totuşi, în realitate, sistemul imun este în stare să răspundă de formarea Ig specifice la un număr nelimitat de antigene diferite. Pentru soluţionarea acestei contradicţii, Dreyer şi Bennett au emis o ipoteză în 1965, postulând existenţa în genomul unui limfocit B a unui număr de câte 1 000 de gene, care controlează biosinteza lanţurilor L, respectiv H, şi astfel devine posibilă codificarea unui număr de un milion de structuri antigenice deosebite. Valabilitatea acestei ipoteze, dar şi explicarea unei variabilităţi superioare a Ig, a fost demonstrată de Susumo Tonegawa, laureat al premiului Nobel pentru medicină (1987). S-a reuşit şi localizarea în cromozomi a genelor respective.

Gena izotipului L al lanţurilor L este localizată în cromozomul 22, al lanţurilor K în cromozomul 2, iar ansamblul genelor, care controlează biosinteza izo- şi alotipurilor lanţurilor H, în cromozomul 14.

În reglarea biosintezei lanţurilor L (ambelor izotipuri) participă mai multe gene. Biosinteza domeniului cu secvenţa aminoacidică constantă (Lv) este controlată de o singură genă. În apropierea acesteia se găsesc încă *4 locusuri J*, care comandă secvenţa porţiunii J de joncţiune, situată între cele 2 domenii Lv şi Lc. Secvenţele aminoacidice din porţiunile variabile şi hipervariabile sunt codificate în 300 de gene diferite. În urma recepţionării stimulului antigenic specific se alege câte o singură genă V şi J, care se potrivesc epitopului. Fiind vorba de elemente mobile, genele alese se deplasează în imediata apropiere a genei C. Cele trei elemente formează un exon unic, a cărui informaţie se transcrie în ansamblu, în ARNm şi se traduce ca atare într-o structură specifică.

Formarea lanţurilor H este puţin mai complicată. În cazul acesta, alături de cele 3, respectiv 4 gene C, care controlează biosinteza domeniilor HC_1, HC_2 şi HC_3, respectiv HC_4, în afară de cele 4 gene J şi de 300 gene V, mai există şi un număr de 10-20 gene D (*diversitate, diversity*). În sfârşit, şi în acest caz se alege câte o variantă de V, J şi D, care alunecă până la locusul genelor C, formează cu ea exonul comun, care se transcrie şi se traduce ca atare tot într-o structură peptidică H specifică. Mecanismul genetic al reglării biosintezei Ig este prezentat în figura 100.

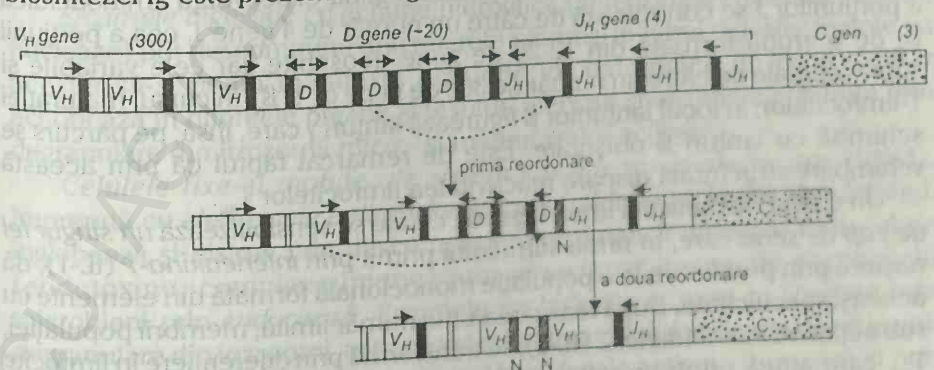


Fig. 100. Reglarea genetică a biosintezei imunoglobulinelor.

Imunoglobulinele monoclonale

Folosirea imunoglobulinelor specifice pentru scopuri analitice este mult îngreunată de heterogenitatea lor excesivă. Folosind omogenitatea absolută a imunoglobulinelor din gradienţii monoclonali produşi de liniile celulare monoclonale transformate malign, Cesar Milstein şi Georges Köhler (laureaţi ai premiului Nobel pentru medicină, 1984) au elaborat metoda hibridizării pentru obţinerea în cantităţi mari a anticorpilor specifici. Dat fiind că şi la şoareci apar limfoame maligne, principiul metodei constă în imunizarea şoarecilor sănătoşi cu un antigen purificat. Din splina animalelor sensibilizate se izolează imunocitele şi se lasă să fuzioneze cu limfocitele dintr-o clonă transformată malign. Celulele fuzionate se numesc hibridoame, care au o durată de viaţă nelimitată în mediul de cultură şi produc în continuare imunoglobuline monoclonale cu specificitate absolută, folosite pe scară largă pentru scopuri de diagnostic, dar şi de tratament.

6.1.3. Receptorul T-limfocitar

Pentru desfăşurarea răspunsului imun legat de celule (CD_8 sau T_{8k}) este necesară prezenţa pe suprafaţa acestor limfocite a unei structuri moleculare receptoare, numită *receptorul T*. În mod similar cu imunoglobulinele, aceste structuri receptoare sunt capabile să prezinte printr-un mecanism genetic analog al Ig, structuri complementare (*paratopi*) structurilor determinante considerate improprii, de origine virală, microbiană, parazitară sau tisulară.

Structura receptorilor T, ancorate în membranele limfocitelor T este compusă din două lanţuri peptidice deosebite: α, cu masa moleculară de 50 000 d, şi ß cu masa moleculară de 39 000 d. Ele au câte un domeniu cu secvenţă aminoacidică constantă, desemnate α_c şi $ß_c$, precum şi unul cu secvenţă variabilă (α_v şi $ß_v$) şi hipervariabilă aminoterminală. Ambele domenii sunt legate între ele printr-o secvenţă aminoacidică de joncţiune (J), lanţurile ß conţinând şi o secvenţă aminoacidică de diversitate (D). Biosinteza fiecărui domeniu constant este controlată de câte o genă C. Secvenţa aminoacidică a porţiunilor J se controlează de către un număr de 4 gene J, cea a porţiunii D, de o grupă formată din 12-20 de gene deosebite, iar cele variabile şi supravariabile de către un număr de 300 de gene α_v şi $ß_v$. În cursul maturaţiei T-limfocitelor, în locul lanţurilor ß figurează lanţuri γ care, însă, pe parcurs se schimbă cu lanţuri ß obişnuite. Este de remarcat faptul că prin această schimbare structurală dispare reactivitatea limfocitelor T_{8k}.

În cursul răspunsului imun legat de celule se sensibilizează *un singur fel de cap de serie* care, în urma stimulului primit prin *interleukina-1* (IL-1), dă naştere prin proliferare la o populaţie monoclonală formată din elemente cu aceeaşi specificitate. După realizarea unui număr limită, membrii populaţiei, sub acţiunea *interleukinei-2* (IL-2), se transformă prin diferenţiere în limfocite T_{8k}, care atacă printr-un contact direct exclusiv elementele purtătoare de epitop, faţă de care ele s-au sensibilizat.

6.2. Apărarea nespecifică a organismului

Apărarea nespecifică şi specifică, celulară şi umorală a organismului împotriva diferiţilor agenţi patogeni este asigurată prin funcţiile şi interacţiunile variate şi multiple ale *sistemului imun*. *Imunitatea* înseamnă deci *apărare*, dar în nici un caz în sensul *teleologic* (de *utilitate absolută*) al termenului. Mecanismele de apărare, deşi sunt îndreptate împotriva agenţilor patogeni, acţionează în diferitele organe şi ţesuturi proprii organismului. Ca urmare, acţiunile lor dăunătoare se vor manifesta şi împotriva elementelor structurale proprii. Astfel, succesiunea reacţiilor de apărare împotriva unei agresiuni biologice începe totdeauna cu manifestarea *reacţiilor antiagresive*, care, însă, în acelaşi timp şi în mod inevitabil vor manifesta şi *efecte autoagresive*.

6.2.1. Apărarea nespecifică celulară-tisulară

Pe plan nespecific, organismul se apără împotriva invaziei microorganismelor patogene prin *bariere tisulare, enzime distrugătoare* (hidrolaze), *celule fixe* şi *mobile*.

Tegumentele (epiteliul dermic, mucos şi secretor) se opun invaziei agenţilor patogeni, cu câteva excepţii (*Leptospira*, parazitul *Strongyloides stercoralis*).

Substanţa fundamentală glicozaminică, polimerul poros şi limitat, dar practic fără sfârşit al *acidului hialuronic*, dincolo de rolul ei substanţial în circulaţia lichidului tisular, reprezintă o barieră practic de netrecut pentru microbi. Câţiva agenţi patogeni, producători ai enzimei hialuronidaza (factor de dispersie, *spreading factor*, SF) pot totuşi invada ţesutul conjunctiv, inclusiv vasele, în urma descompunerii reţelei de acid hialuronic.

Enzimele digestive cu acţiune hidrolitică (glucozidaze, proteaze, lipaze, nucleaze) pot descompune unii microbi pătrunşi în tubul digestiv, înainte ca aceştia să-şi poată manifesta acţiunile lor patologice. În mod similar acţionează în diferitele organe şi ţesuturi afectate şi enzimele eliberate prin degranulare din lizozomii micro- şi macrofagelor activate.

Celulele fixe şi mobile ale sistemului macrofag-monocitar (SMM), împreună cu *elementele polimorfonucleare* (microfage, PMN) ale sângelui, înglobează şi distrug prin descompunere enzimatică agregate moleculare (endotoxine, complexe imune) prin *pinocitoză*, respectiv corpusculii microbieni prin *endocitoză*. Enzimele lor hidrolitice, puse în libertate prin degranulare din lozozomi, acţionează şi în afara celulelor, dar cu riscul lezării şi a structurilor proprii din apropiere. Macrofagele activate formează şi pun în libertate încă o serie de mediatori, ca interleukine, prostaglandine.

6.2.2. Apărarea nespecifică umorală

În cursul reacţiei de fază acută, elemente celulare ale SMM activate produc şi eliberează în circulaţie o serie întreagă de substanţe biologic active: enzime şi diferiţi mediatori, purtători de semnale. Aceşti factori îşi manifestă acţiunile lor comune la nivelul sistemului microvascular, producând o *inflamaţie microvasculară leucocitoclastică*, uneori şi *necrotizantă*. Microvasculita reprezintă deci forma generală de manifestare a inflamaţiilor.

Printre enzimele lizozomiale, eliberate din macrofage, predomină serinproteazele, din care există un număr de peste 40 de feluri deosebite în organism. Activându-se reciproc prin proteoliză, totalitatea acestor serinproteaze alcătuieşte *sistemul umoral proteolitic al apărării*. Membrii săi sunt prezenţi şi acţionează peste tot în organism, pornind de la elementele figurate albe, prin sistemul bradikininoformator şi iniţiator al inflamaţiei, de hemostază şi coagulare-fibrinoliză, până la sistemul citolitic nespecific al properdinei şi specific al complementului. Dintre factorii cuprinşi în acest sistem, o însemnătate deosebită îi revine sistemului chininoformator. Kalicreina activată de factorul Williams pune în libertate din glicoproteina numită chininogen *bradichinina*, mediatorul peptidic care produce toate simptomele obiective şi subiective ale inflamaţiei. Componenţii sistemului umoral proteolitic al apărării şi interacţiunile lor sunt prezentate în figura 101.

Reglarea proteolizei

Sistemul umoral proteolitic al apărării, prin proprietatea membrilor de a se activa reciproc, reprezintă un mijloc substanţial atât în lupta împotriva agenţilor patogeni, cât şi în producerea leziunilor morfologice şi a tulburărilor funcţionale proprii. În majoritatea cazurilor, aceste leziuni şi tulburări nici nu sunt produse de agenţii înşişi, ci mai mult de agresivitatea serinproteazelor proprii. În asemenea cazuri, agenţii patogeni *apasă numai câte un buton declanşator* pe "*tabloul de comandă*" a inflamaţiei, în urma căreia se iniţiază avalanşa activării explozive a proteazelor.

Activitatea serinproteazelor în lichidele biologice şi în ţesuturi este limitată în spaţiu şi timp de către alte glicoproteine, numite *antiproteaze*. Aceste glicoproteine, cu masa moleculară între 54 000 şi 82 000 d, produse în hepatocite, dispun în molecula lor de secvenţe aminoacidice, care sunt rezistente la proteoliză şi se potrivesc în miezul activ al serinproteazelor. Prin acoperirea centrului activ al acestora împiedică desfăşurarea activităţii hidrolitice. Unele antiproteaze, ca α_1-antitripsina, au un spectru larg de acţiune, altele însă, acţionează exclusiv asupra unui singur fel de substrat (trombina împotriva fibrinogenului). Evoluţia şi gravitatea (extinderea sau stingerea) unei inflamaţii microvasculare este determinată de modificarea succesivă a raportului dintre cantitatea proteazelor şi antiproteazelor prezente.

Modularea temporară a inflamaţiei

Modulatorii pe termen scurt ai inflamaţiei sunt *nişte derivaţi lipidici numiţi prostaglandine* şi *leucotriene* (SRS-A). Prostaglandinele au fost identificate la

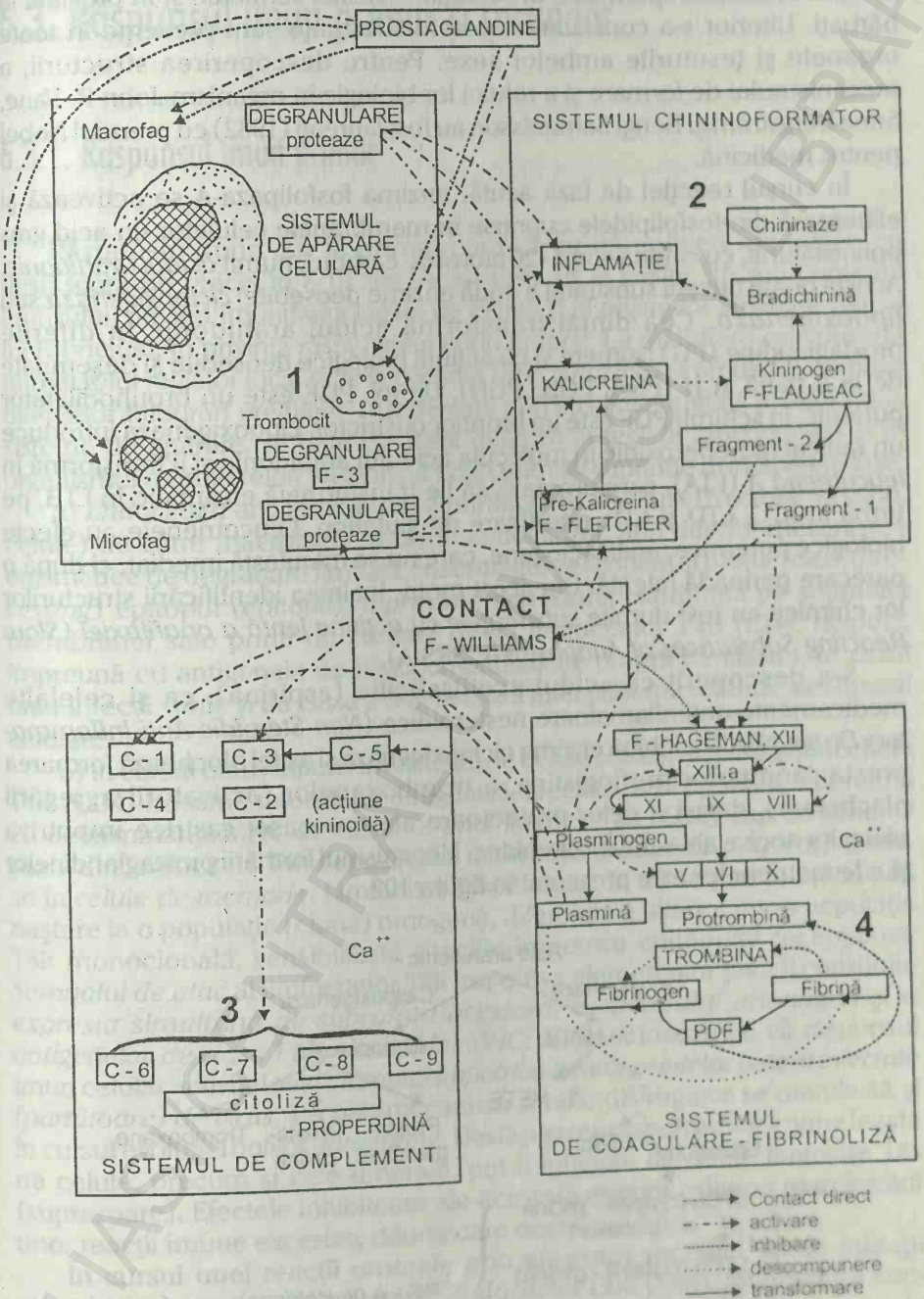


Fig. 101. Sistemul proteolitic umoral.

început în lichidul spermatic, în secreţia veziculei seminale şi în prostată la bărbaţi. Ulterior s-a constatat că aceste substanţe sunt prezente în toate organele şi ţesuturile ambelor sexe. Pentru descoperirea structurii, a mecanismului de formare şi a rolului lor biologic în organism John R. Vane, Sune Bergström şi Bengt Samuelsson au fost laureaţi (1982) cu premiul Nobel pentru medicină.

În cursul reacţiei de fază acută, enzima fosfolipaza-A se activează şi eliberează din fosfolipidele cuprinse în membranele celulelor un acid gras polinesaturat, cu catenă lungă (20 atomi de carbon), numit *acidul arahidonic*. Acesta poate deveni substratul a două enzime deosebite: *ciclooxigenaza* sau *lipooxigenaza*. Cea dintâi transformă acidul arahidonic în diferite prostaglandine (PG) izomere şi cu acţiuni biologice deosebite şi desemnate de la A până la H (PGA, PGB...PGH). De ex. PGE este un bronhodilatator puternic, în schimb PGF este un bronhoconstrictor. Lipooxigenaza introduce un radical hidroperoxidic în molecula acidului arahidonic şi îl transformă în *leucotriena A* (LTA), care urmează să fie transformată enzimatic în LTB, pe urmă în LTC, LTD şi LTE, prin fixare de glutation. Leucotrienele au efecte biologice puternice, anafilactogene, care nu se manifestă imediat, ci după o oarecare perioadă latentă. Din acest motiv, înaintea identificării structurilor lor chimice au fost numite *substanţele cu acţiune lentă a anafilaxiei* (*Slow Reacting Substances of Anaphylaxis*, SRS-A).

S-a descoperit că acidul acetilsalicilic (aspirina), ca şi celelalte medicamente antiinflamatoare nesteroidice (*Non Steroidic Anti Inflammatory Drugs*, NSAID), inhibă enzima ciclooxigenaza şi astfel blochează formarea prostaglandinelor proflogistice, a tromboxanelor (activatorii agregării plachetare), dar şi a celor protectoare ale mucoasei gastrice împotriva efectelor nocive ale acidului clorhidric. Mecanismul formării prostaglandinelor şi a leucotrienelor este prezentat în figura 102.

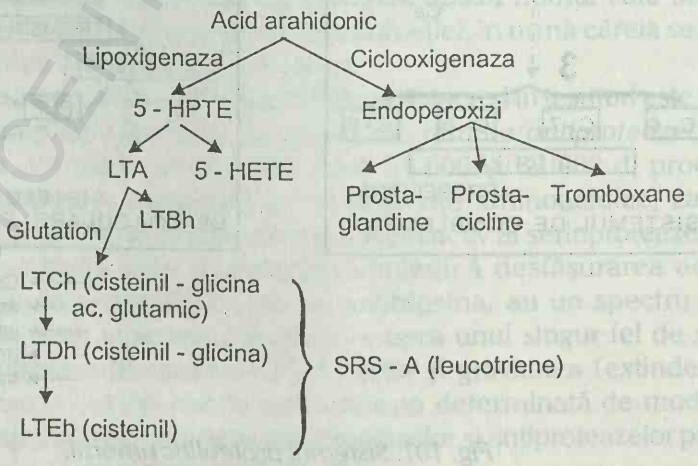


Fig. 102. Mecanismul formării prostaglandinelor şi al leucotrienelor.

6.3. Răspunsul imun primar și secundar

6.3.1. Răspunsul imun primar

Răspunsul imun dat la primul contact cu un antigen imunogen se desfășoară de obicei în 8-12 zile. Acest răspuns la păsări stă sub controlul timusului, privind imunitatea legată de celule și al organelor limfatice (bursa lui Fabricius), în privința răspunsului imun umoral. La mamifere este dovedit numai rolul reglator local și de la distanță (prin *timozină*) al timusului. Pe baza diferitelor tulburări ereditare, manifestate prin lipsa diferențiată a celor două sisteme de apărare, se pare că acest dualism al reglării funcționează și în organismul mamiferelor. Răspunsul imun primitiv cuprinde următoarele faze:

a) *Endocitoza* antigenului sau a purtătorului acestuia (microbi, virusuri, celule) de către macrofage. În urma endocitozei, prin diferite mecanisme enzimatice de degradare limitată, macrofagul descoperă și prelucrează (*processing*) epitopul (epitopii); îi *prezintă* sub forma exprimată pe suprafața membranei sale printr-un contact direct limfocitelor T4h (CD4, helper), împreună cu antigenele de histocompatibilitate proprii de clasa I, în cazul unor infecții virale și de clasa a II-a, în cazul infecțiilor microbiene sau invazii celulare.

b) În cursul unui răspuns imun legat de celule (de ex. antiviral) limfocitele T4h (CD4) transmit informația antigenică specifică recepționată, împreună cu determinanții MHC de clasa I a unui limfocit T8k (CD8) cap de serie. O parte din limfocitele T4h depozitează informația antigenică, transformându-se în *celule de memorie*. Limfocitul T8k stimulat, în urma proliferării lui, dă naștere la o populație (clonă) omogenă, diferențiată ulterior într-o populație T8k monoclonală, sensibilizată specific împotriva epitopului recepționat. *Semnalul de atac* al limfocitelor T8k împotriva elementelor țintă îl constituie *expresia simultană pe suprafața acestora, a epitopului imunogen și a antigenelor de clasa I ale sistemului MHC*. Aceasta înseamnă că răspunsul imun celular antiviral este îndreptat *împotriva tuturor celulelor proprii infectate (purtătoare) de virus*. Un patomecanism similar distrugător se manifestă și în cursul evoluției *bolilor autoimune*. Desfășurarea răspunsurilor imune legate de celule, precum și cele umorale, pot fi inhibate de unele limfocite T8s (supresoare). Efectele inhibitoare ale acestora asigură evitarea manifestării unor reacții imune excesive, dăunătoare organismului.

În cursul unei reacții umorale prin anticorpi specifici (ca în infecții microbiene), macrofagele prezintă limfocitelor CD4 (T4h), tot printr-un contact direct, epitopii microbieni, însă, de data aceasta, împreună cu antigenele de clasa a II-a ale sistemului MHC. Stimulul specific recepționat este, pe de o parte păstrat și depozitat în unele *celule de memorie*, pe de altă parte predat unui *limfocit B cap de serie*, capabil pentru adaptarea unora dintre genele V multiple la codificarea paratopului corespunzător epitopului sensibilizant.

Acest cap de serie este stimulat pentru proliferare tot de către IL-1. Populaţia monoclonală se transformă apoi în plasmocite imunoglobulinoformatoare, prin diferenţierea iniţiată tot de IL-2.

Antigenele neorganizate în structurile diferitelor particule infecţioase, care circulă liber în sânge şi alte lichide din organism, se pot combina şi direct cu receptorii de membrană (Ig de diferite clase) ai limfocitelor B încă neangajate. În cazul contactului cu un element cap de serie receptiv, acesta se stimulează şi intră în contact cu un limfocit T_{4h} (purtător al aceloraşi markeri ai sistemului MHC clasa a II-a). Acesta din urmă începe să producă IL-1, declanşatorul proliferării numerice a populaţiei B monoclonale şi depozitează informaţia antigenică recepţionată. Apariţia anticorpilor specifici circulanţi rezultă în urma diferenţierii limfocitelor B monoclonale în plasmocite, sub acţiunea IL-2. Pentru reglarea răspunsurilor imune umorale, mai ales în stingerea formării anticorpilor specifici în urma vindecării bolii, un rol deosebit le revine *determinanţilor idiotipici ai Ig*, prin formarea *anti-anticorpilor blocanţi*.

Prin faptul că limfocitele T_{4h} (CD4) participă activ la manifestarea tuturor tipurilor reacţiilor imune, aceste elemente celulare ocupă o poziţie cheie în apărarea imună a organismului. Figura 103 prezintă rolul funcţional central al limfocitului T_{4h} (CD_4) în mecanismele de apărare.

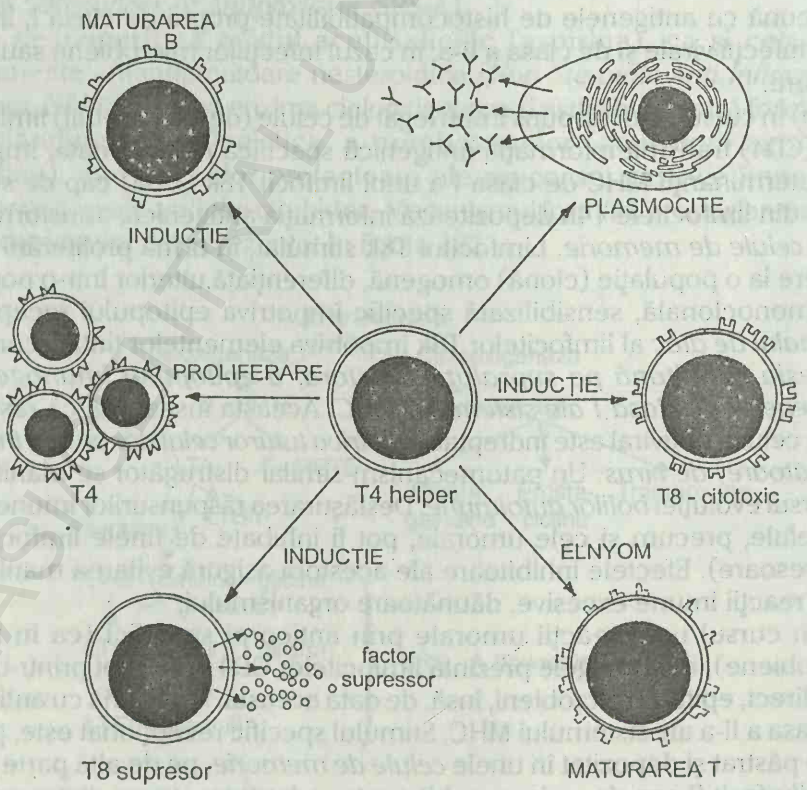


Fig. 103. Rolul central al limfocitului T_{4h} (CD_8^+) în răspunsuri imune.

Purtătorii de semnale ale răspunsului imun. Comunicările intercelulare multiple în cursul răspunsului imun celular și umoral se manifestă prin formarea și acționarea unor purtători de semnale de natură proteinică, numite *citokine* sau *interleukine*, prezentate în tabelul 34.

Tabelul 34

Proprietățile, originea și efectele biologice ale interleukinelor

Denumirea	Masa kD	Locul de formare	Ținta	Acțiunea
IL-1	17	macrofage	Limfocite B și T	proliferare
IL-2	15	limfocit CD_4	Limfocite B și T	diferențiere
IL-3 IFN	23	macrofag	celule infectate	apărare antivirală
IL-4 IFNß	20	fibroblast	celule infectate	apărare antivirală
IL-5 IFN	20	CD_4, CD_8	celule infectate	apărare antivirală
IL-6	26	macrofag	hepatocite	reactanți de fază acută
IL-7	25	celule sușă	precursori T, B	proliferare
IL-8	9	macrofag	polimorfonucleare	proliferare
IL-9	38	limfocit T	megacarioblast	proliferare
IL-10	18	limfocit T CD_8	macrofage, CD_4	inhibiția proliferării
IL-11	23	celule sușă	limfocite B	diferențiere
IL-12	40	B-limfoblaști	T-limfoblaști	proliferare

Rețeaua imună. Nils Kay Jerne, laureat al premiului Nobel în medicină (1981), consideră că sistemul imun al organismului uman, prin numărul extrem de mare al elementelor sale celulare funcționale (circa 12 bilioane = 10^{12} limfocite, formând mai multe milioane de capete de serie și populații individuale monoclonale), precum și prin numărul și mai mare (zeci de mii de trilioane, 10^{22}) de molecule de imunoglobuline specifice diferite (anticorpi) formează o *rețea imună* (*network*) complexă și unitară. Pe plan funcțional, această rețea poate fi comparată cu rețeaua multisinaptică și multifuncțională a neuronilor din sistemul nervos central.

6.3.2. Răspunsul imun secundar

Răspunsul imun secundar înseamnă manifestarea reacției celulare și/sau umorale a sistemului imun în urma unui contact repetat cu markerul imunogen. În cazul acesta, la prezența antigenului reacționează celulele de memorie deja sensibilizate, care declanșează rapid proliferarea și diferențierea clonei celulare respective. Totuși, pentru realizarea numărului de celule citotoxice T8k limfocitare este necesară o perioadă mai lungă de timp. Astfel, reacția imună secundară legată de celule are nevoie de o perioadă de 48-72 de ore până la manifestarea ei perceptibilă. Din această cauză ea a

fost numită *reacţie de tip întârziat*, prototipul ei fiind intradermoracţia (IDR) de tuberculină, efectuată cu 2 sau 10 U PPD.

Reacţia imună umorală, manifestată prin producţia de anticorpi specifici, apare în câteva ore, în urma contactului nou cu antigenul. Aceasta a primit denumirea de *reacţie imună de tip imediat*. Soluţia sterilă a unui antigen, reinjectată intradermic la o persoană presensibilizată, duce la manifestarea rapidă a unei inflamaţii microvasculare locale dureroase, deoarece în urma formării pe loc a complexelor imune (antigen-anticorp) se activează sistemul complement, care prin liza celulelor afectate produce necroza structurilor din apropiere.

6.4. Apărarea specifică a organismului

În cadrul apărării specifice a organismului funcţionează aceleaşi mecanisme celulare şi umorale ca şi în cadrul celei nespecifice, cu două aspecte diferite: în cursul unui răspuns imun specific aceste mecanisme sunt puse în funcţiune, pe de o parte de agenţi specifici, iar pe de altă parte – tocmai din cauza aspectului specific –, intensitatea şi randamentul acestora sunt mult superioare celor nespecifice.

Scopul fundamental al apărării specifice a organismului îl constituie deosebirea *structurilor individuale, proprii* (*self*) de cele *improprii* (*non self*), chiar şi în cadrul aceleiaşi specii sau familii. Această *individualitate biologică* a organismelor se realizează prin existenţa pe suprafaţa celulelor lor a unor *structuri macromoleculare specifice, numite markeri*, identice la toate celulele proprii, dar deosebite de cele existente pe celulele altor indivizi. Ca urmare, toate celulele purtătoare ale acestor markeri vor fi recunoscute ca proprii, fără manifestarea unei reacţii de respingere. În schimb, markerii deosebiţi ai celulelor altor indivizi vor fi consideraţi improprii şi vor declanşa din partea sistemului imun reacţii restrictive de apărare multiple împotriva lor.

6.5. Tulburările înnăscute și dobândite ale imunității

Scăderea sau lipsa totală a apărării organismului poate să se manifeste din cauza tulburării izolate sau combinate a celor 4 feluri principale de mecanisme celulare şi/sau umorale, nespecifice şi/sau specifice: endocitoza şi sistemul umoral al serinproteazelor; sistemul citolitic al properdinei,

respectiv al complementului; răspunsul imun umoral, prin imunoglobuline specifice; răspunsul imun legat de celule.

6.5.1. Tulburările ereditare ale endocitozei

a) *Boala granulocitară cronică Wegener*, este o boală ereditară rară, transmisă în legătură cu cromozomul X. Simptomele debutează la vârsta de 2 ani, cu limfadenite, hepatosplenomegalie, pneumonii, osteomielite, abcese organice și tisulare repetate. Lizozomii deficitari ai macro- și microfagelor nu pot distruge microbii endocitați, printre care unii neobișnuiți, ca *Staphylococcus epidermidis, Serratia narcescens*, ciuperca *Aspergillus*. Microbii viabili sunt transportați de către leucocitele migratoare în diferite organe și țesuturi în care produc granuloame. Leucocitele nu pot reduce în *vitro* colorantul *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) în *formazan*, deci proba cu NBT este negativă.

b) *Deficiența glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei* apare din cauza lipsei ereditare din granulocite a enzimelor NADH- și NADPH-oxidaza. În lizozomi nu se produc cantități suficiente de peroxizi; ca urmare, scade și distrugerea intralizozomială a microbilor. Capacitatea reductivă a celulelor este însă păstrată, astfel testul cu NBT este normal.

c) *Deficiența ereditară a mieloperoxidazei*: producția intralizozomială a peroxizilor este normală, însă microbii endocitați nu se distrug din cauza lipsei eliberării oxigenului atomic (0').

d) *Sindromul Steinbrinck-Chediak-Higashi* este o boală ereditară rară a lizozomilor granulocitari, transmisă autozomal recesiv. Este caracterizat prin infecții microbiene recurente grave, hepato-splenomegalie, albinism parțial, tulburări ale sistemului nervos central și frecvente malignizări limforeticulare. Pe frotiul periferic colorat, lizozomii giganți apar în citoplasma granulocitelor, ca niște incluziuni gigante. Chemotactismul celulelor și distrugerea intralizozomială a microbilor sunt deficitare; în schimb producerea peroxizilor nu este afectată.

e) *Sindromul Iov* este o variantă a granulomatozei *Wegener*. Bolnavii sunt chinuiți de frecvente abcese reci cutanate, tisulare, profunde, ganglionare (stafilococice), recurente.

f) *Rezistența la Tuftsin*: tetrapeptidul *Tuftsin* (Tre-Liz-Pro-Arg), izolat din fragmentul Fc al imunoglobulinelor și obținut prin sinteză de către cercetătorii Universității din *Tufts* (SUA), are un efect chemotactic puternic în *vitro* asupra granulocitelor. În comparație cu cele normale, granulocitele cu absență ereditară a receptorilor respectivi nu reacționează la *"tuftsin"*-ul adăugat la mediul lor de cultură.

g) *Sindromul leucocitului leneș* (*Lazy Leucocyte Syndrome* = LLS) este o altă boală ereditară rară, transmisă autozomal recesiv. Se manifestă cu neutropenie, scăderea chemotactismului în *vitro*, eczeme recidivante și unele infecții microbiene. Agenții obișnuiți (epinefrina, endotoxinele microbilor

Gram-negativi) administraţi subcutanat la bolnavi nu produc creşterea numărului leucocitelor circulante.

h) *Imunodeficienţa ereditară cu cantitatea crescută a IgE* în plasmă este tot o boală ereditară rară, transmisă autozomal recesiv, cu chemotactismul în *vitro* scăzut al granulocitelor, cu eczeme variate şi infecţii microbiene repetate cu *Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus*, tipul A şi tipul ß-hemolitic.

6.5.2. Tulburările dobândite ale endocitozei

Aceste tulburări se pot manifesta din cauza unor infecţii grave (septicemii), intoxicaţii, radiaţii ionizante, tratamente citostatice excesive.

6.5.3. Deficiența ereditară a factorilor properdinici și de complement

Consecinţele grave ale lipsei congenitale a unor factori de complement şi properdină se explică prin localizarea genelor factorilor de complement C2, C4 şi a factorului B properdinic în apropierea genelor markerilor sistemului MHC în cromozomul 6. Aceste deficite se asociază diferitelor stări imunodeficitare. Cu excepţia factorului C8, a cărui lipsă înnăscută încă nu a fost semnalizată, sunt cunoscute cazuri de lipsă ereditară a tuturor factorilor (între C1-C8) de complement şi properdină. Deficienţa ereditară a acestor factori apare totdeauna sub formă solitară. Simptomatologia deficitului vreunui factor se produce cu o susceptibilitate mare faţă de infecţii, prin distrugerea intralizozomială insuficientă a germenilor, scăderea formării imunoglobulinelor şi în cazul unei predispoziţii crescute la manifestarea unor imunopatii cronice evolutive (dermatomiozită, lupus eritematos diseminat, pemfigus, purpură anafilactoidă).

6.5.4. Stări imunodeficitare ereditare legate de limfocitele B

Imunoglobulinele prezente în laptele de mamă asigură necesarul în anticorpi al sugarului până la vârsta de 6 luni. La această vârstă începe producţia proprie de anticorpi a sugarului, prin apariţia limfocitelor B cu markeri de membrană din clasa IgM. Până la vârsta de 1 an apar şi limfocitele B purtătoare de IgG, peste câteva luni şi cele marcate cu IgA. Semnele clinice ale tulburării globale sau separate ale biosintezei diferitelor clase de Ig se manifestă, deci, după împlinirea acestei vârste la sugarii alimentaţi cu lapte de mamă, dar mai devreme la cei cu nutriţie artificială.

a) *Agamaglobulinemia congenitală cu transmisie recesivă, legată de sex.* Primul caz a fost descris de Bruton (Elveţia), din care cauză se numeşte şi de tip *elveţian*. Boala apare la băieţi şi debutează cu infecţii microbiene repetate oto-rino-laringeale, pulmonare, digestive şi meningeale, urmate de septicemii, în urma dispariţiei Ig de origine maternă, transmise transplacentar. Din proteinogramă lipseşte fracţiunea gamaglobulinică, lipsesc şi anticorpii din serul sugarilor. Nu pot fi identificate limfocite B, nici în sângele periferic, nici în măduva roşie. Sunt însă prezente toate tipurile limfocitelor T; ca urmare, imunitatea legată de celule (de ex. antivirală) este intactă.

b) *Hipogamaglobulinemia cu grad de expresie variabil* se manifestă cu scăderea variată a cantităţii Ig serice din toate clasele, deşi numărul limfocitelor B circulante este normal. Hipogamaglobulinemia este cauzată foarte probabil de scăderea producţiei IL-2 de către limfocitele CD4 (*helper*). La copiii afectaţi se manifestă frecvent imunopatii cronice evolutive de tip juvenil (poliartrită reumatoidă, celiakie, malignizări).

c) *Scăderea sau lipsa congenitală a IgA şi IgG, cu creşterea IgM serice* este o boală ereditară rară, transmisă recesiv, legată de sex. Linia de dezvoltare a limfocitelor se întrerupe după faza marcată cu IgM. Manifestările clinice ale bolii sunt similare cu cele ale tipului elveţian, dar mai puţin severe.

c) *Scăderea sau lipsa selectivă congenitală a IgM serice* este o formă rară şi paradoxală de imunopatie înnăscută, deoarece formele următoare ale dezvoltării limfocitelor B, marcate cu IgG şi IgA, sunt prezente în sânge, împreună cu Ig din clasele corespunzătoare. Simptomele bolii sunt similare cu cele descrise mai sus.

e) *Lipsa selectivă ereditară a IgA serice* reprezintă forma cea mai frecvent întâlnită (1:10) a hipogamaglobulinemiilor ereditare, transmisă autozomal recesiv. Este caracterizată prin infecţii microbiene frecvente ale căilor respiratorii, precum şi prin manifestarea microvasculitelor hipersenzitive leucocitoclastice.

6.5.5. Tulburările ereditare ale imunității din cauza absenței sau disfuncției limfocitelor T

a) *Aplazia timică (sindromul Di George)* este o boală ereditară rară, transmisă autozomal recesiv şi cauzată de tulburarea dezvoltării embrionare a arcurilor branhiale 3 şi 4. Simptomele apar din momentul naşterii, prezentând malformaţii în regiunea facială (hipertelorism, implantare auriculară coborâtă, retrognatism, fisură palatină, ochi antimongoloizi), hipocalcemie cu contracţii tetaniforme, malformaţii cardiace (stenoza arterei pulmonare, defect septal atrial, transpoziţia vaselor mari, tetralogia Fallot, artera subclavie aberantă etc.).

b) *Candidiaza mucocutanată cronică, cu sau fără enteropatie*: din cauza absenţei limfocitelor T şi a absenţei apărării imune legate de celule deficitare infecţiile cu Candida pe mucoase şi tegumente se manifestă rapid.

6.5.6. Tulburările ereditare combinate ale limfocitelor B și T

Aceste boli ereditare rare sunt caracterizate prin afectarea simultană a liniilor limfocitare B şi T, transmise de obicei autozomal recesiv.

a) *Alimfocitoza globală ereditară cu agamaglobulinemie* este o imunopatie înnăscută şi rar întâlnită, dar foarte severă, cu lipsa aproape totală a reacţiilor imune umorale şi legate de celule. Se transmite autozomal recesiv, uneori legată şi de cromozomul X. Bolnavii nu resping nici alogrefele, dar imunocitele străine prezente în acestea produc reacţia grefei contra gazdă (GVHR). O variantă mai puţin severă a acestei boli, cu prezenţa unor cantităţi reduse de Ig în sânge este reprezentată de *sindromul Nezelof*.

b) *Imunodeficienţa ereditară combinată cu ataxie şi teleangiectazie* se transmite autozomal recesiv. Debutează la vârsta de 2 ani cu ataxie, teleangiectazii cutanate şi tisulare-organice, infecţii repetate ale căilor respiratorii. La 40% din cazuri se manifestă şi o lipsă selectivă a IgA serice.

c) *Sindromul Wiscott-Aldrich* se manifestă cu eczeme şi trombocitopenie. Diateza hemoragică este prezentă din momentul naşterii. Cantitatea de IgM serică este scăzută, IgA şi IgG serice sunt, însă, crescute.

d) *Imunodeficienţa ereditară cu nanosomie prin extremităţi scurte* se poate manifesta sub trei forme distincte. Tipul I prezintă semnele deficienţei simultane ale funcţiilor B şi T ale limfocitelor, în tipul II predomină scăderea numerică şi funcţională a limfocitelor T, iar tipul III este caracterizat prin scăderea mai mult sau mai puţin marcantă a Ig serice.

e) *Lipsa ereditară a enzimelor adenozin-deaminaza (ADA) şi nucleozidfosforilaza (NPL) din imunocite* face ca substraturile lor să nu se transforme şi acumulându-se în imunocite să inhibe manifestarea funcţiilor acestora.

6.5.7. Tulburările dobândite ale apărării imune

Aceste deficienţe se manifestă în cursul vieţii din cauza unor imunosupresori de natură fizică (radiaţii ionizante), chimică (medicamentoasă, ca în urma efectuării unui tratament cu corticosteroizi, citotoxice, ciclosporină) şi biologică (stări carenţiale, limfectomie chirurgicală, tumori maligne, paraziţi, microbi şi virusuri), dar şi printr-o paralizie imună manifestată în urma vaccinărilor efectuate cu doze excesive de antigen. Aceste tulburări se manifestă sub forma unor hipogamaglobulinemii izolate

sau combinate. Din punctul de vedere al evoluției ele pot fi reversibile sau definitive.

a) *Reacția grefă contra gazdă (GVHR)* apare în urma pătrunderii într-un organism imunodeficitar a imunocitelor heteroloage dintr-o alogrefă, care se sensibilizează împotriva determinanților MHC de clasa I a celulelor gazdei. O dată declanșată GVHR nu mai poate fi oprită și printr-o continuă amplificare duce inevitabil la distrugerea organismului invadat. În condiții similare, imunocitele dintr-un volum mare (5-6 l) de sânge proaspăt transfuzat, pot declanșa o GVHR. În asemenea cazuri, în scop preventiv, se recomandă iradierea flacoanelor cu o doză de 3 000 r înainte de transfuzie.

b) *Infecția cu virusul imunodeficienței umane* (HIVD). Tabloul clinic al primilor doi bolnavi tineri (bărbați homosexuali), suferind de un sindrom de imunodeficiență dobândit (SIDA, AIDS), internați și investigați la Clinica de boli contagioase din Los Angeles a Universității din California (UCLA) a fost publicat de Michael Gottlieb (1981). Ulterior s-a constatat că boala apare frecvent la toxicomani (prin folosirea în comun a acelor și seringilor), la heterosexuali, prin folosirea instrumentarului medical insuficient sterilizat sau a sângelui infectat (transfuzii) și de la mamă seropozitivă la făt.

Agentul patogen al bolii, virusul imunodeficienței umane (HIV) a fost izolat, identificat și numit LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*), în 1984, de Luc Montagnier (Institutul Pasteur din Paris) și de Robert Gallo (National Cancer Institute, SUA) care a propus denumirea de HTLV-III (*Human T-Cell Leukemia Virus*, tipul III). Ulterior s-a constatat că cei doi agenți sunt identici, fapt pentru care OMS a propus folosirea denumirii HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), iar pentru boala cauzată, HIVD (D de la *disease*, boală).

HIV este un retrovirus, conținând ARN, cu un genom format din 9 gene. Dintre acestea una codifică biosinteza *transcriptazei inverse*, care transcrie informația genetică virală din ARN în ADN-ul din genomul celulelor infectate. Structura particulei HIV este prezentată în figura 104.

Țintele HIV sunt limfocitele T4h (CD4). Prin distrugerea lor, răspunsurile imune legate de celule și cele umorale devin practic inexistente. Ca urmare, organismul bolnav devine victima unor infecții banale, oportuniste (*nozocomiale*), atât prin agenți patogeni obișnuiți, cât și rari (*Pneumocystis carinii*), de transformări maligne, inclusiv cele limforeticulare, ca sarcomul *Kaposi*.

Diagnosticul serologic al bolii a devenit posibil prin punerea în evidență a anticorpilor anti-HIV, cu ajutorul unei metode ELISA (*Enzyme Linked Immune Sorbant Assay*). Testul *Western Blot* detectează anticorpii formați împotriva diferitelor antigene HIV (GP-20 din anvelopa miezului, GP-120 din capsida virionului, transcriptaza inversă, endonucleaza) adsorbite pe un strat de nitroceluloză. Cu ajutorul metodelor de imunofluorescență se pot detecta anticorpii specifici în complexele imune formate cu antigenele HIV în celulele infectate, fixate pe lamă. Anticorpii anti-HIV față de determinanții din miezul și/sau anvelopa virionului pot fi detectați și cu EIA (*Enzyme Immuno Assay*). Pentru detectarea prin amplificare a genomului HIV în lichide biologice,

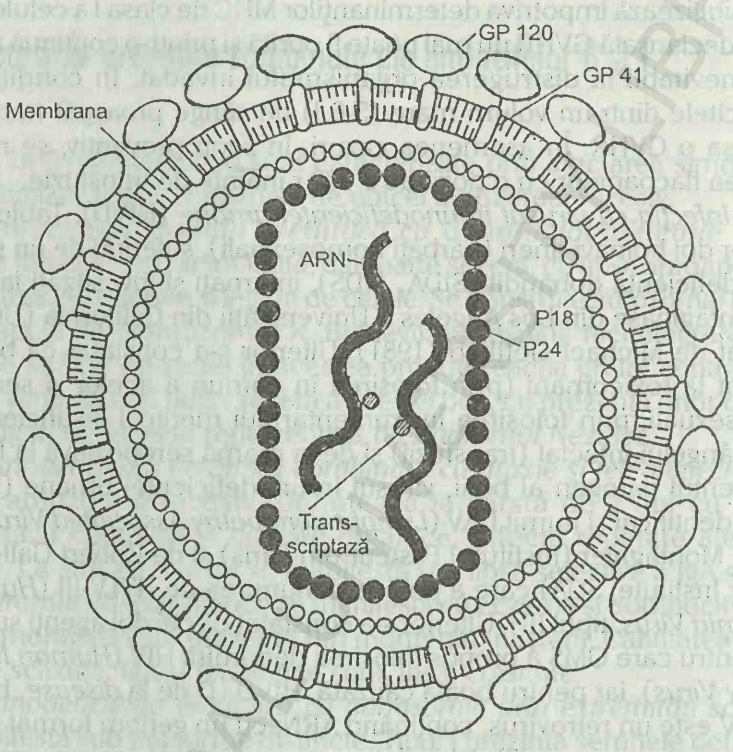


Fig. 104. Structura virionului HIV.

ţesuturi şi organe recent a fost elaborată metoda *reacţiei de polimerizare în lanţ* (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

Majoritatea simptomelor HIVD sunt nespecifice. Totuşi, pe baza observaţiilor făcute de până acum, s-a reuşit delimitarea unei *stări patologice complexe* (*AIDS Related Complex*, ARC), a căre manifestare ridică suspiciunea infecţiei. Formele de manifestare a acestui complex cuprind 4 grupe de boli:

Grupa I: infecţie acută (sub formă de mononucleoză, meningită, mielopatie, neuropatie, encefalită, erupţii cutanate, angină, hepatită acută icterică).

Grupa II: infecţie asimptomatică, cu o perioadă de latenţă între 6 luni şi 2-3 ani.

Grupa III: limfadenopatie persistentă generalizată.

Grupa IV: alte boli, ca boala constituţională, boala neurologică, boala infecţioasă secundară (*criptosporidiază, toxoplasmoză, strongiloidoză, candidiază, criptococoză, histoplasmoză, micobacterioze, herpesviroze, leucoplachie orală*), neoplazii secundare (*sarcom Kaposi, limfoame non-*

hodgkiniene, carcinoame, limfom cerebral primitiv), pneumonia interstițială limfocitară, precum și alte inflamații.

Din cauza variabilității mari a antigenicității capsulare a HIV, nici până în prezent nu s-a reușit elaborarea unui vaccin eficace împotriva HIVD. Pe plan simptomatic, infectarea T-limfocitelor CD_4 încă intacte poate fi împiedicată temporar prin administrarea β-interferonului (*Suraminei*). *Medicamentul azidotimidina* (AZT), denumită și *Retrovirină*, a fost sintetizat de George Hitchings (laureat cu premiul Nobel pentru medicină în 1988). Compusul conține o *grupare amido* pe atomul de carbon 3 al dezoxiribozei, făcând-o astfel incapabilă pentru a se angaja în reacția de formare a legăturii fosfatesterice, care stă la baza polimerizării mononucleotizilor, adică a lungirii semispiralelor. Administrarea în scop terapeutic a acestei substanțe, însă, nu a putut confirma speranțele formulate pe plan teoretic.

O descoperire mai recentă în acest domeniu constă în administrarea terapeutică a unui inhibitor enzimatic (numit Saquinavir, având sinonimele Ritonavir și Indinavir), admis în SUA din decembrie 1995, care inhibă acțiunea intracelulară a unei proteaze virale, care desface prin proteoliză în fragmente mai mici macroproteina virală codificată de genele Gal-Pol. În lipsa fragmentelor de scindare, asamblarea capsomerelor și eliberarea altor enzime importante (integraza, transcriptaza inversă) devine imposibilă. Astfel, la Conferința Internațională despre HIVD, ținută în august 1996 la Vancouver, s-a trecut în revistă combinația medicamentoasă activă și eficace formată din Acyclovir, AZT și Saquinavir, prin administrarea căreia s-a și reușit obținerea unor remisii de durată la bolnavii tratați.

Deși în condiții experimentale, prin adăugarea unor combinații de substanțe cu efecte antivirale la mediile de cultură ale T-limfocitelor CD4 infectate cu HIV s-a reușit eliminarea virusului, atât din celulele cultivate, cât și din mediul lor nutritiv, problema vindecării HIVD totuși nu poate fi considerată rezolvată. Ca urmare, în perioada actuală, mijlocul cel mai eficient în eliminarea posibilității infecțiilor ocazionale cu HIV îl constituie aplicarea riguroasă și consecventă a măsurilor igienico-sanitare și sociale adecvate.

6.6. Imunitatea antitumorală

În urma acționării continue a factorilor cancerigeni de origine fizică, chimică și biologică, externi sau interni (oncogene), este posibil ca în organism, chiar în fiecare zi, să apară celule transformate malign. Datorită unei *supravegheri imune* continue(*immune surveillance*), aceste celule se descoperă și se distrug de către *macrofagele* și *limfocitele* T_0 sau TNK (*Natural Killer*), înainte ca ele să se multiplice într-o măsură necontrolabilă.

Deşi nu toate celule neoplazice dispun de markeri deosebiţi de cei fiziologici, la majoritatea pot fi, totuşi, identificate structuri antigenice, diferite, numite *neoantigene*. Aceste structuri pot fi clasificate în următoarele 3 grupe:

a) *Antigenele de diferenţiere*: apar numai într-o fază determinată a maturaţiei unor serii celulare, ca în cazul elementelor imature din cadrul unor leucemii limfoide sau granulocitare. Aceste antigene pot fi identificate cu ajutorul anticorpilor monoclonali specifici.

b) *Antigenele retrogenetice*: în condiţii fiziologice ele sunt exprimate exclusiv pe suprafaţa celulelor embrionare, dar nu şi a celor de după naştere. Din această cauză ele se numesc şi *antigene oncofetale*. În această grupă sunt înşirate α*-fetoproteina* (AFP) şi *antigenul carcinoembrionar* (CEA), care pot reapare după naştere în caz de neoplazie gastro-intestinală primitivă (hepatică, respectiv intestinală, pancreatică) sau pulmonară.

c) *Antigenele de transplantare, asociate tumorilor* (TAA): animalele de experienţă presensibilizate de aceste antigene resping tumora purtătoare a acestora. Identificarea acestor antigene în serul bolnavilor, precum şi a anticorpilor specifici formaţi împotriva lor este o problemă deosebit de importantă, atât din punct de vedere diagnostic, cât şi terapeutic.

Majoritatea tumorilor maligne întâlnite la om, însă, nu sunt imunogene şi nu dispun de TAA, cu excepţia tumorilor de origine virală, ca virusul Epstein-Barr (VEB), virusul leucemiei limfocitelor T (HTLV), melanoamele, unele tumori cerebrale şi renale. Aceste TAA sunt foarte puţin imunogene, deşi circa 50% din bolnavii cu melanom malign le conţin în plasmă şi numai la 6% apar şi anticorpi specifici faţă de acestea. Ele apar însă mult mai frecvent în sângele bolnavilor cu limfocite T, sensibilizate împotriva celulelor purtătoare de TAA (T_{8k}, CD_8), care sunt în stare să distrugă celulele neoplazice respective şi în *vitro*.

Un argument important pentru existenţa în cadrul sistemului imun al apărării antitumorale este frecvenţa mare a apariţiei unor forme de neoplazii (limfoame, carcinoame) la bolnavi imunodeficitari (în urma iradierii, tratamentului citostatic, HIVD). De asemenea, s-a dovedit şi rolul cancerigen al razelor UV în exces.

Nedescoperirea şi neeliminarea din organism, într-o perioadă de timp potrivită a unei neoplazii, duce la creşterea progresivă şi mai târziu la metastazarea acesteia. Paralel cu creşterea masei tumorale, scade proporţional şi capacitatea de apărare antitumorală a organismului, din cauza următoarelor mecanisme imunosupresoare:

a) *Dezvoltarea imunotoleranţei* faţă de markerii tumorali: sistemul imun de apărare *recunoaşte TAA ca proprii*. Acest mecanism poate fi determinat genetic, prin condiţionarea unui răspuns imun antitumoral mai slab, sau chiar absent din partea sistemului MHC;

b) *Mascarea markerilor tumorali*: glicozaminoglicanele din glicocalixul pericelular sau unele complexe imune depuse pe suprafaţa celulelor neoplazice pot ascunde markerii lor TAA;

c) *Eliminarea TAA de pe suprafața celulelor neoplazice* prin năpârlire;

d) *Modularea antigenelor*: prin mutații genetice, epitopii antigenelor suferă modificări atât de însemnate, încât ei nu mai pot fi recunoscuți de receptorii imunocitelor;

e) *Substanțe blocante*: markerii eliberați de pe suprafața celulelor tumorale se fixează pe receptorii limfocitelor T8k sensibilizate. Astfel, ei blochează receptorii, care devin incapabili să intre în contact cu aceștia.

6.7. Imunomodularea

Atât scăderea, cât și creșterea excesivă a răspunsului imun înseamnă o stare patologică mai mult sau mai puțin periculoasă pentru organism. Astfel, în urma identificării cauzei și gravității tulburării, urmează luarea măsurilor terapeutice imunostimulatoare sau imunosupresoare adecvate.

6.7.1. Imunostimularea

Funcționarea sistemului imun poate fi stimulată în mod direct, prin *intermediul modificatorilor răspunsului biologic* (*Biological Response Modifier*, BRM), prin extracte biologice, medicamente sintetice și indirect prin administrarea unor adjuvanți.

a) Grupa celor care modifică răspunsul biologic cuprinde purtătorii de semnale proteinice (interferonii, interleukina-2, factorii de creștere). α-Interferonul (IL-3) este utilizat în tratamentul unor tumor maligne și leucemii (de ex. cu celule păroase). Acesta se administrează și în cazuri de hepatită virală B și C. Dat fiind că interferonii pătrund în celulele încă intacte, ei împiedică infecția virală ulterioară a acestora, efectele lor pozitive limitându-se pe perioada administrării lor.

Acțiunile de proliferare și de diferențiere celulară a interleukinelor se folosesc mai mult pe plan indirect. În urma extirpării chirurgicale a unei tumori, limfocitele T izolate din sângele pacientului se introduc într-un mediu de cultură, la care se adaugă în prezența extractului antigenic tumoral propriu: IL-1, în vederea proliferării și IL-2 purificat, în vederea diferențierii celulelor cultivate. După creșterea numerică dorită a celulelor, suspensia lor se reintroduce prin transfuzie în sângele bolnavului. Limfocitele CD_8 sensibilizate împotriva markerilor tumorii extirpate descoperă și distrug cu mare probabilitate celulele tumorale eventual rămase, prevenind recidivarea tumorii.

b) Extractele numeroaselor microorganisme şi plante conţinând polizaharide, lectine şi polipeptide prezintă efecte imunostimulatoare (Bronhodin, Cantastin).

c) Printre medicamentele imunostimulatoare, cele mai cunoscute sunt levamizolul (Decaris) şi isoprinosina, cea din urmă fiind recomandată în tratamentul virozelor imunodeficitare. Timostimulina şi timopentina sunt derivaţii sintetici ai hormonului timic, timozina. Administrarea lor se recomandă în tratamentul stărilor imunodeficitare şi al unor tumori maligne.

d) Grupa adjuvanţilor răspunsului imun. Adjuvanţii sunt substanţe care stimulează răspunsul imun. De mult este cunoscut faptul că antigenul adsorbit pe hidroxidul de aluminiu are un efect imunogen mai exprimat. La animalele de experienţă se foloseşte *demult adjuvantul complet al lui Freund* (FCA), cu ajutorul căruia poate fi suspendată toleranţa imună faţă de autoantigene şi ca urmare poate fi provocată manifestarea pe plan experimental a unor boli autoimune. Un adjuvant puternic este reprezentat de BCG, folosit cu succes în tratamentul carcinomului vezicii urinare. Dintre derivaţii activi ai BCG *muramilpeptidele* stau pe primul loc. Extractele lipopolizaharidice (LPS) microbiene, lipsite de efecte endotoxinice, sunt adăugate la unele vaccinuri. Vitaminele antioxidante (A, E şi C) stimulează activitatea enzimei *superoxid dismutaza* şi ca urmare apără structurile celulare proprii împotriva efectelor nocive ale oxigenului atomic (O'). Acţiunile imunostimulatoare ale unor oligoelemente, ca litiul, seleniul şi zincul se manifestă probabil prin funcţiile din imunocite ale unor metaloenzime. În sfârşit, este de remarcat că reacţiile imune sunt îmbunătăţite printr-o alimentaţie adecvată, o bunăstare fizică şi psihică.

6.7.2. Imunosupresarea

Reducerea sau suprimarea manifestării reacţiilor imune este indicată în vederea tratamentului unor boli autoimune, cu creşterea excesivă a activităţii (agresivităţii) imunocitelor sau a apărării grefei în urma unui transplant de ţesut sau organ. În funcţie de natura şi intensitatea hiperfuncţiei imune pot fi folosite numeroase mijloace fizice, chimice şi biologice:

1) Radiaţiile ionizante distrug elementele funcţionale ale sistemului imun. Efectele lor dăunătoare se manifestă mai mult în urma accidentelor tehnice; iradierea pentru scopuri terapeutice a ganglionilor limfatici, a timusului sau a corpului întreg se practică extrem de rar, în cazuri refractare la alţi factori imunosupresori.

2) Grupa substanţelor chimice conţine o serie întreagă de compuşi proprii organismului, precum şi medicamente.

a) *Hormonii corticosteroizi.* Hormonii corticosuprarenali şi derivaţii lor sintetici au un mecanism complex de acţiune, manifestând în acelaşi timp atât efecte imunosupresive şi antiinflamatoare, cât şi metabolice multiple.

Fiind liposolubili se transportă în sânge sub formă legată de o ß-globulină transportoare, *numită transcortina*. Tot din cauza liposolubilității lor steroizii traversează ușor membranele celulelor țintă. Din acest motiv, în membrana celulelor nici nu se găsesc receptori corticosteroizi. În citoplasma lor sunt, însă, dispersate proteine care fixează selectiv corticosteroizii. Complexele formate din receptori și steroizi se deplasează spre nucleul celular. În nucleu se leagă de histone, activează o serie de gene aflate în repaus și opresc activitatea altora. Astfel, hormonii corticosteroizi acționează pe un teren foarte larg: alături de acțiunea lor inhibantă, manifestată la nivel hipotalamico-hipofizar, prin care provoacă involuția cortexului suprarenal propriu, reduc proliferarea și funcțiile macrofagelor, a elementelor polimorfonucleare și a plachetelor sanguine, inclusiv producția de interleukine IL-1 și IL-6, respectiv de prostaglandine; inhibă proliferarea și diferențierea limfocitelor T, inclusiv producția lor de IL-2; în schimb au influență mică asupra producției de imunoglobuline; inhibă degranularea mastocitelor; reduc numărul eozinofilelor circulante; inhibă activitatea de colagenogeneză a fibroblaștilor; provoacă osteoporoza; în doze mare favorizează formarea ulcerelor gastrice și duodenale; acționează antiinsulinic; duc la retenția renală a sodiului și eliminarea excesivă a potasiului ș.a. Activitatea imunosupresoare a corticosteroizilor se manifestă deci prin ansamblul acestor mecanisme variate și multiple, care, în contrast cu unele efecte terapeutice imediate pozitive, pot acționa pe termen lung în sens negativ, chiar și în sensul creșterii predispoziției la neoplazii. Pe baza acestor considerente, indicația unui tratament corticosteroidic de lungă durată trebuie să fie bine gândită și motivată. În cazurile în care este suficientă numai reducerea inflamației se recomandă administrarea *medicamentelor cu acțiune antiinflamatorie nesteroidică* (*Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs*, NSAID). În cazul hiperfuncției excesive a macrofagelor, compușii chimici coloidali ai aurului blochează exocitoza enzimelor lor lizozomiale catabolice. O reacție de fază acută exagerată, prin formarea excesivă a reactanților de fază acută, inclusiv ceruloplasmina are drept consecință nocivă excesul de cupru care poate fi prevenit prin chelatarea lui cu D-penicilinamină. Unele substanțe antimalarice, cloroquina și hidroxicloroquina, acționează ca inhibitori moderați în faza S a ciclului celular. Pe baza efectelor lor adverse mult mai reduse ele pot fi administrate cu succes în tratamentul unor viroze și al bolilor autoimune condiționate de acestea.

b) *Substanțele citostatice* administrate în terapia neoplaziilor acționează și împotriva imunocitelor. Unele dintre ele își manifestă citotoxicitatea indiferent de faza ciclului celular, ca substanță alchilantă *ciclofosfamida*. Altele sunt *specifice de fază* ca *antagoniștii folici* (ametopterina = metotrexatul), *antagoniștii purinici* (mercaptopurina, azatioprina = imuranul) și *pirimidinici* (acidul chinolincarbonic).

c) *Ciclosporina A* (Sandimun) este un decapeptid ciclic, extras de E. Wanger din ciuperca *Tolypocladium inflatum Gams* (1980). În citoplasma imunocitelor, ciclosporina inactivează prin fixare enzima *ciclofilina*,

activatoarea unei fosfataze calciu-dependente, numită *calcineurina*. Din cauza inhibării ciclofilinei, nu mai funcţionează *nici factorul nuclear al limfocitelor T activate* (NF-AT). Ca urmare, se opreşte şi biosinteza mai multor interleukine şi limfokine, ca IL-2, 3, 4 şi 5, factorul de necroză tumorală (TNF), factorul de colonizare al macrofagelor şi granulocitelor (MG-CSF). Pe baza mecanismului de acţiune bine delimitat, precum şi a efectelor adverse practic absente ciclosporina se administrează cu precădere în prevenirea respingerii grefelor alogene, dar şi în tratamentul unor boli autoimune severe. O substanţă recent obţinută cu structură similară, numită *rapamicină*, are mecanisme analoage cu ciclosporina, dar are efecte adverse mai reduse.

d) *Anticorpii citotoxici şi blocanţi antilimfocitari*, obţinuţi prin sensibilizarea unor animale cu limfocite T sau B umane. În urma administrării parenterale a acestor seruri numărul limfocitelor circulante scade bruc în câteva ore. Readministrarea acestor preparate este imposibilă, din cauza manifestării bolii serului la bolnavi, din cauza sensibilizării lor faţă de proteinele serice alogene ale animalului respectiv.

e) Doze mari de imunoglobuline intravenoase (cu fragmentele Fab îndepărtate enzimatic), nu numai că înlocuiesc anticorpii absenţi din organismul bolnav, dar prin blocarea receptorilor Fc ai macrofagelor şi inhibiţia acţiunii stimulatoare a limfocitelor CD_{4h} (helper), manifestată faţă de plasmocitele formatoare de Ig, au şi un efect imunosupresor.

b) În cazuri grave, efectele nocive ale factorilor celulari şi umorali circulanţi pot fi suspendate imediat, dar temporar prin exsanguinotransfuzie, sau plasmafereză, respectiv leucofereză. Ultimele două implică separarea plasmei (sau a limfocitelor) din sângele recoltat de la bolnav şi retransfuzia elementelor figurate suspendate într-o plasmă normală (sau retransfuzia sângelui propriu separat de limfocite).

6.8. Reacţiile imune patologice

Schimbarea (creşterea, scăderea sau dispariţia) reactivităţii imune duce la manifestarea unor răpunsuri imune patologice şi în urma unei stimulări antigenice obişnuite, Hans von Pirquet, încă la începutul secolului (1906), a folosit pentru caracterizarea reactivităţii imune normale *termenul de normoergie*, celei crescute *hiperergie*, celei scăzute *hipoergie* şi pentru lipsa reactivităţii *termenul de anergie*, cele trei forme patologice din urmă fiind cuprinse în categoria alergiei, adică a reactivităţii alterate. În ciuda acestei terminologii clare şi exacte, în terminologia medicală contemporană s-a păstrat exclusiv termenul "alergie", care este folosit numai pentru expresia *hipersensibilităţii*, adică a reactivităţii imune excesive.

Schimbările reactivității imune, evoluând pe baza unor patomecanisme deosebite, pot fi cauzate de diferiți factori. În primul rând leziunile morfologice organice și tisulare și tulburările funcționale ce apar în cursul acestor imunopatii acute sau cronice în majoritatea lor sunt cauzate de efectele nocive ale mecanismelor de apărare proprii organismului. În al doilea rând, consecințe și simptome similare, uneori chiar identice, pot fi cauzate prin mecanisme fundamental diferite. Se recomandă deci ca, atât înaintea punerii diagnosticului, cât și la formularea strategiei terapeutice să fie identificați factorul cauzal și patomecanismul bolii. Pe baza patomecanismelor lor individuale, R.R.A. Coombs și F. Gell (1961) au grupat *reacțiile imune patologice* în 4 tipuri diferite:

1. **Reacția imună patologică de tipul I (alergic, anafilactic sau atopic)**. Aceasta este caracterizată de sensibilizarea organismului bolnav cu unele substanțe (*alergene*) care nu sunt imunogene la marea majoritate a populației. Reaginele specifice (IgE) formate împotriva acestor alergene se fixează cu porțiunile lor Fc pe suprafața *mastocitelor* tisulare și în prezența alergenului provoacă eliberarea prin degranulare a mediatorilor activi depozitați, care duc la apariția simptomelor caracteristice alergo-anafilactice. Sistemul properdinic sau de complement nu se activează și ca urmare nu se produc leziuni tisulare necrotice prin citoliză.

2. **Reacția imună patologică de tipul II, citotoxic**. Antigenele sunt fixate sau exprimate pe suprafața celulelor țintă. Reacția antigen-anticorp se desfășoară tot pe suprafața acestora, urmată de fixarea și activarea complementului, declanșând liza elementelor celulare afectate (anemii hemolitice, trombocitopenii, granulocitopenii, glomerulonefrite, inflamații necrotizante etc.).

3. **Reacția de tipul III (Arthus), prin complexe imune circulante**. Reacția antigen-anticorp are loc în fază lichidă (plasmă, lichid tisular). Complexele imune formate circulă în sânge și se pot depune întâmplător oriunde pe endoteliul vaselor. La locul depunerilor se activează complementul, se declanșează citoliza, urmată de o *microvasculită hipersenzitivă leucocitoclastică necrotizantă*. Evoluția inflamației este determinată de raportul dintre formarea și epurarea (eliminarea, descompunerea) complexelor imune circulante. Acest tip de reacție predomină în patomecanismul majorității bolilor autoimune cronice evolutive (LED, PCE, dermatomiozită etc.).

4. **Reacția imună patologică de tipul IV, mediată celular**. Această reacție este cauzată de sensibilizarea excesivă a limfocitelor T, CD_{8+} citotoxice care se manifestă prin contactul direct cu antigenul sensibilizant, exclusiv în regiunea acțiunii acestuia. Acest mecanism apare în eczeme, dermatite prin contact, HVGR. Această clasificare include și un al V-lea tip al reacțiilor imune patologice, care cuprinde tulburările comunicărilor inter- și intracelulare, în urma modificărilor patologice ale diferiților receptori de membrană pentru mesagerii primari sau/și secundari. Dat fiind că patogenia acestor așa-zise "*boli ale receptorilor*" cuprinde unul sau, sub formă combinată, mai multe

mecanisme din cele 4 tipuri de reacţii imune patologice, deosebirea celui de-al V-lea tip propus nu pare să fie justificată.

6.8.1. Reacţia imună patologică de tipul I (alergic, anafilactic sau atopic)

În terminologia medicală actuală *alergia* înseamnă hipersensibilitate, *anafilaxia* semnalează lipsa de apărare a organismului faţă de un imunogen, iar *atopia* (noţiune introdusă de Coca în 1921) exprimă caracterul extraordinar, neobişnuit al bolii care nu poate fi cuprinsă (nu are loc = *topos*) în nici o clasificare existentă, deoarece apare exclusiv la unele persoane cu o sensibilitate deosebită.

Alergenele sunt substanţe puternic polare, de origine variată (vegetală, animală şi sintetică), imunogene la persoanele sensibile, dar absolut inerte faţă de restul populaţiei.

Reaginele sunt anticorpi (imunoglobuline din clasa IgE) formaţi în organismul sensibil faţă de un alergen. Prezenţa lor în serul unei persoane atopice a fost pusă în evidenţă prima dată de E. Prausnitz şi A. Küstner, cu ajutorul *reacţiei anafilactice cutanate*. Küstner era alergic la proteine de peşte. În urma injectării intradermice a serului său lui Prausnitz, insensibil la acest alergen, au apărut şi la el semnele locale ale hipersensibilităţii. De atunci, acest tip de reacţie de sensibilizare pasivă locală, sub denumirea de *reacţia Prausnitz-Küstner*, a fost introdusă în practica medicală pentru identificarea alergenelor.

Reaginele postulate la bolnavii atopici au fost identificate, în 1966, de T. Ishizaka şi, în 1967, de W. Bennich, la bolnavi cu mielom multiplu, prezentând gradientul M format dintr-o clasă de Ig, până atunci necunoscută. Această clasă a fost numită IgE şi identificată cu reaginele din plasma persoanelor hipersensibile. Masa moleculară a IgE este de 190 000 d, cu un conţinut glucidic de 12%. Serul unei persoane sănătoase conţine 250 ng/ml (2,3 ng = 1 UI) IgE, cu o perioadă de înjumătăţire de 2, 7 zile. Din cauza conţinutului atât de redus al plasmei, cantitatea IgE poate fi determinată exclusiv cu RIA sau ELISA.

Imunoglobulinele E se comportă ca anticorpi specifici citofili, porţiunile aderente la structurile celulare specifice sunt localizate în domeniile C_3 şi C_4. Pe suprafaţa unui mastocit (sau PMN bazofil) se găsesc între 40 000-100 000 receptori pentru porţiunea Fc a IgE. Aceştia sunt glicoproteine cu masa moleculară de 50 000 d. Moleculele IgE fixate pe receptori formează legături sub formă de punţi încrucişate (*bridging*), prin fixarea alergenului la porţiunea lor Fab. Această modificare bruscă conformaţională a complexelor de alergen şi anticorp se transpune prin transducţie şi amplificare, respectiv prin formarea mesagerilor secundari (AMPc, ITP, Ca^{++}, NO) spre interiorul mastocitelor (PMN bazofile). În urma acestei stimulări se eliberează mediatorii depozitaţi din granulele celulelor ţintă. Semnalul principal al degranulării îl constituie scăderea intracelulară a AMPc şi creşterea bruscă a cantităţii de Ca^{++} citoplasmatic.

Mediatorii reacțiilor imune patologice de tipul I anafilactic se eliberează conform principiului "*totul sau nimic*" și acționează din primele momente ale reacției anafilactice declanșate în urma contactului cu alergenul. Până în prezent au fost identificați următorii mediatori eliberați din mastocite, care, din cauza producției lor în propriul organism, precum și a similitudinii acțiunilor lor cu unii alcaloizi vegetali, au fost denumiți și *autacoizi*:

1. *Histamina*: se formează prin decarboxilarea histidinei. Henry Hallett Dale (premiul Nobel pentru medicină în 1936) a constatat, încă în 1906 că histamina administrată parenteral la cobai produce o stare de șoc, care se aseamănă foarte mult cu anafilaxia. Efectele biologice ale histaminei se manifestă prin fixarea ei pe receptori specifici (H_1 în pereții vaselor, H_2 în celulele epiteliale mucoase). Manifestarea efectelor histaminei pot fi inhibate prin administrarea antagoniștilor H_1 (*feniramina*) și H_2 (*cimetidina*).

2. *Serotonina*: este produs prin decarboxilarea triptofanului (*5-hidroxitriptamina*). Deși la unele animale de experiență produce vasodilatare și creșterea permeabilității capilare, în reacțiile alergice umane are numai un rol secundar.

3. *Mediatorii lipidici*: prostaglandinele și leucotrienele (numite anterior SRS-A). În special cele din urmă, fixându-se pe receptorii specifici ai musculaturii netede, duc la manifestarea lentă, dar de durată, a contracției acestora.

4. *Proteoglicanele*: heparina și condroitinsulfații joacă un rol important în fixarea unor mediatori și a altor molecule active încărcate pozitiv, atât în granulele de depozitare ale mastocitelor, cât și sub formă liberă.

5. *Citokine*: în cursul reacției alergice se activează și macrofagele, care produc și eliberează o serie întreagă de proteine purtătoare de semnale, numite citokine sau interleukine: *factorul eozinofil chemotactic* (ECF). Numărul granulocitelor eozinofile circulante crește la bolnavii alergici. Eozinofilele fixează, pinocitează și inactivează mediatorii în exces, acționează și în mod direct împotriva paraziților tisulari; factorul de agregare a plachetelor (PAF); factorul chemotactic neutrofil (NCF); factorul de stimulare a formării coloniilor granulocitelor și ale macrofagelor (GM-CSF).

Pe plan patologic, bolile atopice prezintă următoarele caractere comune: apar numai la om (deși o stare similară de hipersensibilitate poate fi provocată experimental și la câine); alergenele nu sunt imunogene la marea majoritate a altor persoane; hipersensibilitatea nu se moștenește, predispoziția însă se transmite ereditar, de obicei autozomal dominant, cu un grad de penetrare de circa 40%; serul bolnavilor cu atopie conține o cantitate semnificativ mai mare de IgE.

Patomecanismul bolilor atopice

Bolile atopice apar și evoluează pe baza unui patomecanism imun și biochimic complex, pornind de la prima sensibilizare cu alergenul și formarea reaginelor specifice IgE, continuând cu eliberarea mediatorilor și terminând cu manifestarea acțiunilor deosebit de active ale acestora din punct de vedere funcțional. Descoperirea efectelor biologice ale mediatorilor (H.H. Dale, 1906)

a fost urmată de postularea *receptorilor* lor specifici excitanţi (Re) şi inhibanţi (Ri, J. Ahlquist, 1948) şi de identificarea primului *mesager secund* (AMPc) de Earl W. Sutherland (premiul Nobel pentru medicină, 1971). S-a constatat şi faptul că în cadrul comunicărilor inter- şi intracelulare, reactivitatea celulelor ţintă (purtătoare de receptori) este modulată prin următoarele mecanisme:

a) *Reglarea în jos* (*down regulation*): reducerea numărului receptorilor de membrană prin endocitoză sau/şi năpârlire.

b) *Reglarea covalentă*: în cazul excesului intracelular al mesagerului secund (AMPc), *proteinkinazele* fosforilante realizează şi fosforilarea receptorilor. Prin introducerea în molecula receptorilor a unor radicali fosfat legaţi covalent se blochează capacitatea acestora de a fixa mesageri primari.

Pe suprafaţa elementelor musculare netede vasculare şi bronşice se găsesc următoarele tipuri de receptori:

– Receptori α_1 care transmit mesajul recepţionat prin *intermediul inozitoltrifosfatului* şi *diacilglicerolului* şi duc la manifestarea contracţiilor vasculare şi bronşice prin eliberarea rapidă din depozitele celulare a Ca^{++}.

– Receptorii α_2 care funcţionează ca receptori inhibitori (R_i) prin mesagerul secund GMPc şi produc relaxarea musculaturii netede vasculare şi bronşice.

– Receptorii $ß_1$ care sunt receptori excitanţi (R_e).

– Receptorii $ß_2$ sunt receptori inhibitori (R_i). În urma fixării mesagerului primar, *receptorii excitanţi* transmit mesajul preluat *proteinei G*, apoi enzimei *adenilatciclaza*. Aceasta din urmă produce AMPc, activatorul proteinkinazelor, care la rândul lor activează prin fosforilare enzima ţintă a celulei efectoare. Excesul de AMPc este descompus de către enzima *fosfatdiesterază*.

Tonusul musculaturii netede (din pereţii vaselor şi a bronşiolelor) este reglat de echilibrul dintre acţiunile mediatorilor cu efecte biologice opuse (constricţie, dilatare), pe analogia mişcării continue a efectelor excitante (*yin*) şi inhibante (*yang*) cuprinse în teoriile *acupuncturii*. La bolnavii atopici acest echilibru este deranjat datorită scăderii marcante a reactivităţii ß-adrenergice, respectiv creşterii reactivităţii – adrenergice şi colinergice. După teoria lui I. Szentivanyi, acest dezechilibru se datorează foarte probabil unui blocaj al receptorilor ß-adrenergici. Pentru valabilitatea acestei concepţii pledează faptul că degranularea mastocitelor (bazofilelor), precum şi contracţia musculaturii netede bronşice, pot fi prevenite prin creşterea cantităţii intracelulare a AMPc, respectiv scăderea cantităţii citoplasmatice a ionilor de Ca^{++}. ß-Blocanţii (propranololul) inhibă transmiterea intracelulară a mesajului purtat de catecolamine; ca urmare, ei reduc cantitatea citoplasmatică a AMPc. În schimb, provoacă creşterea ionilor de Ca^{++}, care duce la intensificarea forţei musculare miocardice. Această constelaţie este însă spasmogenă la bolnavii cu astm bronşic. Inconvenientul terapeutic este soluţionat prin introducerea ß-blocanţilor cu acţiune selectivă bronşică sau cardiovasculară.

Şocul anafilactic

Se declanşează în urma pătrunderii din nou al unui alergen într-un organism atopic presensibilizat. Reacţia anafilactică se poate manifesta *local*

epitelială a lui *Bowman*. Vasul aferent, în care se adună capilarele glomerulare, se capilarizează din nou, formând vasele recte din jurul tubilor renali. Venele, adunând sângele acestor vase, formează prin confluenţă venele recte, venele arcuate, având şi panicule sinusoide, vene interlobare şi, în sfârşit, vena renală. Rinichii dispun şi de o reţea limfatică bogată.

Fluxul sanguin renal. Prin cele două artere renale, desprinse direct din aorta descendentă, abdominală, rinichii au o irigare sanguină abundentă: din volumul cardiac de 5 l, un litru (20%) trece în fiecare minut prin rinichi. Acest volum se numeşte *fluxul sanguin renal* (*Renal Blood Flow, RBF*). În cunoştinţa valorii hematocritului, se poate calcula şi fluxul plasmatic renal (*Renal Plasma Flow, RPF*), având valoarea normală între 600-650 ml/minut. În comparaţie cu valoarea medie de 90-100 mbar a *presiunii sanguine intraaortice, presiunea capilară glomerulară* este de 70-80 mbar. Din această valoare trebuie să fie scăzută *presiunea intracapsulară renală* de 30-35 mbar, rămânând astfel *presiunea filtrantă efectivă* (presiunea capilară – presiunea intracapsulară) de 35-45 mbar. Din cauza funcţionării autoreglării circulaţiei renale, valoarea presiunii filtrante efective (PFE) rămâne constantă, în ciuda creşterilor însemnate (între 80-220 mbar) ale presiunii arteriale sistemice. Scăderea PFE, însă, manifestată prin tulburarea metabolismului energetic sau scăderea excesivă a presiunii sistemice (colaps, hemoragie) duce la scoaterea din funcţie a autoreglării şi la oprirea filtrării glomerulare.

Circulaţia renală medulară: din volumul total al RBF, 88% trec prin stratul cortical şi 12% prin zona medulară, din care 11% prin cea externă şi 1% din cea internă. În cazul concentrării urinii, debitul circulaţiei medulare scade; în cazul diluţiei, creşte. În aprecierea epuraţiei renale, din valoarea fluxului sanguin şi plasmatic trebuie scăzută valoarea debitului circulaţiei medulare.

Consumul de oxigen al rinichilor: deşi diferenţa presiunii parţiale (PO_2) a oxigenului din sângele arterei şi venei renale, din cauza RBF mare, este de numai 1-2%, aceasta corespunde totuşi unui consum renal însemnat de oxigen: 15-20 mmol/minut, ceea ce reprezintă 5-8% din consumul total de oxigen al organismului.

Reglarea funcţiei renale. Rinichiul denervat în *vivo* funcţionează normal, însă rinichiul de animal izolat excretă o urină izoosmotică, adică îşi pierde capacitatea concentrării şi diluării urinii. Acest fapt pledează pentru preponderenţa mecanismelor de reglare umorală (prin ADH şi aldosteron), în contrast cu reglarea nervoasă.

Funcţiile renale. Deşi nefronul, sub forma unui sistem glomerulotubular, funcţionează ca un tot unitar, se obişnuieşte tratarea separată a funcţiilor glomerulare şi tubulare, precum şi a celor de reglare a presiunii arteriale, a secreţiei de aldosteron şi a hematopoiezei.

Funcţia glomerulară. Prin funcţia glomerulară se realizează ultrafiltrarea plasmei, în raport cu prezenţa factorilor determinanţi, ca RBF, respectiv RPF şi PFE. Filtratul glomerular (urina primară) corespunde deci ultrafiltratului plasmei, conţinând totuşi şi cantităţi reduse de proteine (0,15 g/l = 15 mg %). Urina definitivă este practic lipsită de proteine, deoarece la nivelul tubilor

proximali are loc reabsorbţia proteinelor filtrate. Extracţia (E) unei substanţe din plasmă poate varia între 0 şi 100%, ceea ce corespunde valorilor *gradului de extracţie* între 0 şi 1. Aceste valori indică volumul de plasmă filtrată (Vp) şi epurată astfel de o substanţă oarecare:

$$V_p = \frac{C_u \cdot V_u}{C_p}$$

unde C_u = concentraţia din urină; V_u = volumul urinei; C_p = concentraţia din plasmă.

În cazul unei substanţe care se filtrează în glomeruli, dar nu se reabsoarbe în tubi (creatinina endogenă sau inulina exogenă), valoarea normală a coeficientului de epuraţie se modifică între 100-125 ml/minut. Pentru substanţele care se reabsorb parţial (ureea) valoarea este mai mică (60-80 ml/minut); pentru cele care se reabsorb în întregime (glucoza) este egală cu 0, iar cele care se filtrează dar se şi elimină din sânge prin secreţie tubulară (acidul para-aminohipuric = PAH) prezintă o valoare de clearance foarte mare (700-800 ml/minut).

Funcţiile tubulare cuprind reabsorbţia pasivă parţială sau activă totală a unor substanţe filtrate glomerular şi eliminarea din sânge prin secreţie activă a altora. *Transporturile pasive* tubulare au loc în sensul şi pe seama gradienţilor de concentraţie. *Transporturile active* pot fi *limitate*, de tipul glucozei, având o capacitate maximă limitată (T_{mG}), ca şi în cazul aminoacizilor, proteinelor. În cazul în care filtratul glomerular nu conţine cantităţi excesive ale substanţelor respective, care să depăşească capacitatea maximă a transportului tubular (Tm), urina definitivă va fi lipsită de acestea. În cazul unei filtrări glomerulare excesive, capacitatea Tm se depăşeşte şi substanţele apar în urină, de ex. manifestarea glicozuriei în caz de hiperglicemie. Ca urmare, termenul de "*prag de glucoză*" folosit anterior nu mai este valabil. Transporturile active de tipul electroliţilor sunt nelimitate şi nesaturabile.

Secreţia tubulară. Celulele epiteliale tubulare pot extrage din plasmă şi secretă în urină diferite substanţe, ca acidul paraaminohipuric (PAH). *Capacitatea de secreţie a epiteliului tubular este şi ea saturabilă, ca transportul activ în sens opus, de tipul glucozei. Cantitatea filtrată* a substanţei administrate intravenos corespunde valorii coeficientului de epuraţie (120 ml/min). *Cantitatea excretată* însă este mult mai mare şi poate fi calculată din suma cantităţilor filtrate (F) şi secretate (S): E = F + S. Ca urmare, valoarea cifrică a cantităţii secretate poate fi calculată din diferenţa cantităţilor excretate şi filtrate: S = E - F. Cantitatea secretată la început creşte liniar cu creşterea concentraţiei plasmatice, însă numai până la o anumită limită de 100 mg/l PAH. Acest nivel al concentraţiei plasmatice de PAH se numeşte *limita de autodeprimare* (*Self Depression Limit, SDL*). La valori şi mai mari, capacitatea secretorie se saturează, manifestându-se *limita de saturaţie* (*Saturation Limit, SL*), după care măsura epuraţiei PAH corespunde coeficientului de epuraţie.

În condiţii fiziologice valoarea coeficientului de epuraţie (*clearance*-ul) al PAH se modifică între 700-800 ml/min.

Mecanismul funcţiei glomerulotubulare de concentrare şi de diluare a urinii. Volumul filtratului glomerular este de 180 l în 24 de ore, conţinând printre altele 26 mol (600 g) Na^+ şi 19 mol (650 g) Cl^-, şi având izoosmolaritatea de 300 mosmol/l. În schimb, urina definitivă are un volum de 1,5 l, conţine numai 0,23 mol (5 g) Na^+ şi 0,19 mol (5,5 g) Cl^- şi are osmolaritatea între 650 şi 1 200 mosmol/l, respectiv densitatea între 1 002-1 030. Reiese că prin contribuţia sistemului tubular, cantităţile de apă şi de electroliţi filtrate suferă modificări substanţiale.

Activitatea de concentrare sau de diluare a rinichilor poate fi explorată pe baza valorii coeficientului de epuraţie al apei. În cazul în care valoarea osmolarităţii urinii (U_{OSM}) este egală cu valoarea osmolarităţii plasmei (P_{OSM}), coeficientul de epuraţie (*clearance*) al apei este egal cu zero ($C_{apă} = 0$). În cazul în care valoarea U_{OSM} depăşeşte valoarea P_{OSM}, valoarea $C_{apă}$ devine negativă, ceea ce înseamnă o retenţie de apă, adică concentrarea urinii. În cazul diluării urinii, valoarea U_{OSM} devine inferioară valorii P_{OSM}. Valoarea $C_{apă}$ devenind pozitivă, rezultă o eliminare renală în exces a apei.

La nivelul tubilor renali contorţi proximali, din conţinutul total în apă şi substanţe filtrate în glomeruli se reabsorb în mod obligatoriu circa 70%. Reabsorbţia ionilor are loc în condiţii izoosmotice, urmată de reabsorbţia pasivă a apei. Ca urmare, în această porţiune tubulară, urina primară rămâne izoosmotică. În porţiunea descendentă a ansei lui Henle, celulele epiteliale transportă activ ionii de Na^+ din lumen în interstiţiu, urmaţi în mod pasiv de Cl^-. Prin aceasta, ţesutul interstiţial din jur devine hiperosmotic, iar urina din lumen, hipoosmotică. Celulele epiteliale ale tubilor contorţi distali răspund la acţiunea aldosteronului, prin reabsorbţia sodiului şi a clorurilor şi prin eliminarea potasiului. La acest nivel se manifestă şi schimburile ionice între Na^+ şi H^+. În prezenţa ADH, pereţii tubilor colectori devin permeabili pentru apă, care, din cauza gradientului de concentraţie existent între lumen şi interstiţiu, pătrunde rapid în ţesutul renal hiperosmotic din jur. Din această cauză urina finală devine mai concentrată. *Vârful osmotic* reprezintă acea valoare maximă (1 500 mosmol/l) a osmolarităţii urinii concentrate, la care poate ajunge urina, în comparaţie cu osmolaritatea plasmei (300 mosmol/l). Valoarea vârfului osmotic este limitată de capacitatea transportului activ al epiteliului porţiunii descendente a ansei Henle pentru ionii de Na^+.

Capacitatea de concentrare a rinichilor este dependentă de următoarele condiţii: rata filtrării glomerulare (cantitatea filtrată de apă şi de substanţe) să fie suficient de mare; circulaţia medulară renală să fie suficientă şi funcţia de transport activ pentru Na^+ a porţiunii descendente a ansei Henle să fie intactă.

Difuziunea neionică. Membranele celulare, din cauza compoziţiei lor lipidice, sunt impermeabile pentru apă şi ioni. Totuşi, electroliţii slabi, sub forma lor neionizată (apolară) pot traversa membranele celulare fără nici o dificultate însă, *sub formă ionizată, nu.* Astfel, amoniacul (NH_3) format în

celulele tubulare prin dezaminarea aminoacizilor trece prin difuziune neionică în lumenul tubular, unde fixează un proton (H^+) şi se transformă în cation de amoniu (NH_4^+). Sub această formă poate neutraliza acizi (uraţi, oxalaţi), participând la menţinerea echilibrului acidobazic, dar nu se poate reîntoarce în celule. În mod similar, în cazul unei intoxicaţii cu barbituraţi, acidul barbituric filtrat în urina acidă nu se poate disocia electrolitic şi prin difuziune neionică se reabsoarbe în sânge. În urma alcalinizării urinii (prin perfuzia bicarbonaţilor) acidul barbituric se disociază electrolitic, însă, sub această formă nu se reabsoarbe, ci se elimină rapid din organism prin urină. Între volemia şi osmolaritatea lichidelor biologice există un echilibru dinamic, care se menţine prin reglarea retenţiei şi eliminării apei şi a electroliţilor, respectiv a aportului acestora.

Reglarea renală a echilibrului acidobazic. În comparaţie cu funcţia plămânilor de eliminare a bioxidului de carbon, rinichii participă la menţinerea echilibrului acidobazic prin regenerarea continuă a capacităţii de tampon din sânge. Bicarbonaţii rezultă prin disocierea acidului carbonic (format din bioxid de carbon şi apă), sub acţiunea carboanhidrazei. Ionii de H^+ intracelulari se schimbă cu ionii de Na^+ filtraţi şi prezenţi în lumenul tubilor.

Explorarea de laborator a funcţiei renale. Examenul sumar de urină furnizează informaţii valoroase referitoare la starea funcţională a rinichilor. Culoarea: normală este galben-pai (din cauza urobilinei), dar se poate modifica în funcţie de prezenţa coloranţilor endogeni (hemoglobina, bilirubina) şi exogeni (medicamente). Densitatea: se poate modifica între 1002 şi 1032. O densitate constantă sub 1010 înseamnă *hipostenurie* şi corespunde fazei cu poliurie compensatorie a unei insuficienţe renale. Densitatea urinară constantă de 1010 (egală cu densitatea plasmei) înseamnă *izostenurie* şi corespunde unei stări grave de insuficienţă renală, cu pierderea capacităţii de concentrare şi de diluare a urinii. Valori extrem de mari apar la diabeticii neechilibraţi, din cauza glucozuriei (şi cetonuriei) masive. Reacţia poate fi alcalină, neutră sau acidă, cu aciditatea actuală între pH = 4,5-8,5. În condiţii normale, într-o perioadă de 24 de ore, ca aciditate titrabilă se elimină prin urină maximum 50 mmol acizi. În acidoze sau alcaloze metabolice, aciditatea sau alcalinitatea titrabilă a urinii poate prezenta valori de 5-10 ori mai crescute.

Proteinuria: filtratul glomerular conţine 0,15 g/l proteine, ceea ce înseamnă o cantitate de 18-20 g proteine filtrate pe zi. Marea majoritate a acestei cantităţi se reabsoarbe la nivelul tubilor proximali, încât prin urina definitivă se elimină zilnic numai 0,03-0,05 g proteine, care însă nu pot fi puse în evidenţă cu ajutorul metodelor uzuale. O proteinurie decelabilă înseamnă deci un fenomen patologic, care poate fi de *origine prerenală, renală* sau *postrenală*. Proteinuriile prerenale pot apărea din cauza creşterii marcante a RBF, GFR, a proteinemiei de peste 100 g/l (depăşirea capacităţii T_{mP}), la efort, ortostatism, stază renală din cauza trombozei venei renale etc. Proteinuriile renale sunt cele mai frecvente şi apar în urma unor leziuni glomerulotubulare. Pot fi *selective* (eliminarea exclusivă a albuminelor),

semiselective (albuminurie asociată cu eliminarea unor fracțiuni globulinice cu masa moleculară mai redusă) și *proteinurii neselective*, cu eliminarea tuturor fracțiunilor proteice din plasmă. Proteinuriile postrenale apar în urma unor leziuni ale căilor urinare între pielon și uretră. Dat fiind, că aceste leziuni se manifestă aproape exclusiv cu hemoragii, proteinuriile sunt asociate cu hematurie.

Hemoglobinuria masivă poate fi recunoscută ușor și după aspect. Se poate manifesta în urma unei hemolize, unor infecții, intoxicații și după efort.

Puroiul în urină semnalizează o infecție urinară. Pozitivitatea reacției Donné se corelează cu numărul leucocitelor prezente în sediment.

Glicozuria apare cel mai frecvent la diabetici (juvenili și adulți). În lipsa altor semne ale acestei boli metabolice, trebuie exclusă posibilitatea altor *meliturii* (fructozurie, galactozurie, pentozurii), precum și scăderea sau lipsa capacității T_{mG} a celulelor epiteliale ale tubilor contorți proximali (diabetul renal). Punerea în evidență a glicozuriei trebuie să fie determinată și de cantitatea glucozei eliminată în 24 ore. În urina adunată pe 24 de ore se pot determina o serie de componenți anorganici (ioni) și organici (acidul uric, creatina, acidul vanil-mandelic, acidul 5-hidroxiindolacetic, diferite enzime, metaboliți hormonali etc.).

Creșterea cantității urobilinogenului în urină pledează pentru o afecțiune hepatocelulară, iar lipsa lui totală în caz de icter mecanic semnalizează o ocluzie biliară totală.

Numai bilirubina directă (conjugată) se elimină în urină. Bilirubina indirectă (formată în cazul icterelor hemolitice) nu se elimină. Pentru explorarea corectă a funcțiilor renale privind echilibrul hidromineral, acidobazic, de filtrare glomerulară (coeficientul de epurație), de reabsorbție și de secreție tubulară (epurația PAH) se recomandă determinarea paralelă a parametrilor respectivi, atât din plasmă, cât și din urina adunată pe o perioadă de 24 de ore.

BCU IASI/CENTRU

10 Patochimia sistemului endocrin: mecanismele comunicărilor inter- şi intracelulare

10.1. Comunicările inter- şi intracelulare 471
10.2. Sistemul glandelor endocrine 472
10.2.1. Hipofiza 472
10.2.2. Reglarea secreţiilor hormonale 473
10.2.3. Encefalinele 474
10.2.4. Receptorii α şi β 474
10.2.5. Mecanismul de acţiune a hormonilor steroizi 476
10.2.6. Mecanismul de acţiune a hormonilor tiroidieni 477

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.1. Comunicările inter- și intracelulare

Reglarea funcţiilor celulelor din diferitele ţesuturi şi organe se realizează prin semnalele stimulatoare sau inhibitoare emise de unele sisteme reglatoare şi purtate de nişte mediatori, numiţi *mesageri primari* ai mecanismelor de comunicări inter- şi intracelulare. Purtătorii de semnale, transportaţi de sângele circulant, se fixează în mod specific de către unele *structuri receptoare*, situate pe suprafaţa externă a celulelor ţintă. Fiecare mesager primar comunică exclusiv un singur fel de semnal şi pentru recepţionarea acestuia, serveşte câte un receptor specific deosebit. De fapt, această acţiune stimulatoare este reflectată şi în denumirea de *hormon*, derivat din verbul grecesc *hormao* şi introdus în terminologia medicală de William Maddock Bayliss şi Ernest Henry Starling (1902) pentru desemnarea activităţii stimulatoare a secretinei intestinale asupra pancreasului exocrin. Deşi ulterior s-a dovedit că secretina nu este un hormon adevărat, deoarece acţiunea ei este temporară şi limitată într-o regiune digestivă restrânsă, termenul a fost păstrat şi este folosit şi în prezent pentru denumirea hormonilor adevăraţi.

Comunicările intercelulare realizate prin producerea, eliberarea în circulaţie şi fixarea pe receptorii celulari a unor purtători de semnale

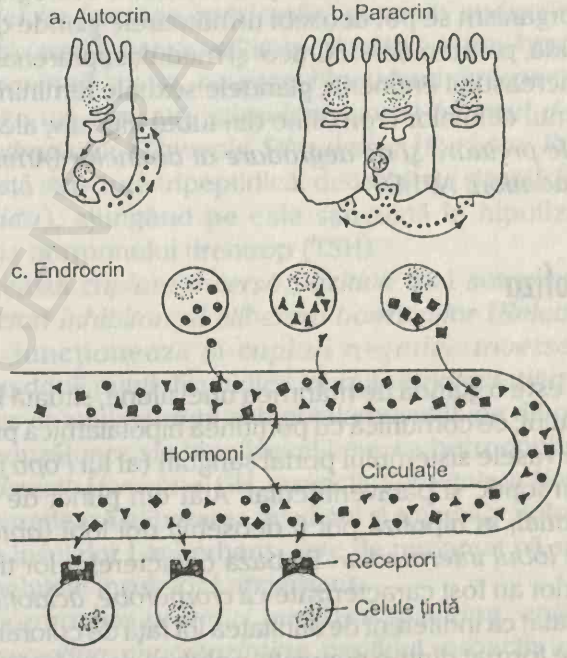


Fig. 107. Schema comunicărilor intercelulare.

(mediatori) se pot manifesta sub mai multe forme: substanţele *autocrine* se formează în interiorul celulelor, se excretă şi se fixează pe receptorii aceloraşi celule. Mediatorii *paracrini*, formaţi şi eliberaţi de unele celule, excită funcţiile altor celule existente într-un număr limitat în apropiere. În sfârşit, purtătorii de semnale *endocrine* sau hormonii adevăraţi se secretă în lichidele biologice şi se transportă prin sânge până la celulele din toate organele şi ţesuturile din organism. Din această multitudine şi varietate a diferiţilor mediatori, mesajele individuale pot fi recepţionate cu exclusivitate numai de către acele celule ţintă, care dispun de receptorul specific pentru fixarea mediatorului respectiv. Diferitele forme ale comunicărilor intercelulare sunt prezentate schematic în figura 107.

O formă deosebită a comunicărilor intercelulare o constituie comunicările interneuronale din sistemul nervos central. Transmiterea nervoasă în sinapsele interneuronale se manifestă prin efectele limitate în spaţiu şi timp ale *neurotransmiţătorilor*.

10.2. Sistemul glandelor endocrine

Pe baza structurii, localizării şi a efectelor biologice ale hormonilor secretaţi în organism se pot deosebi următoarele glande cu secreţie internă: hipofiza, tiroida, paratiroidele, cortico- şi medulosuprarenala, insulele Langerhans ale pancreasului endocrin, glandele sexuale feminine şi masculine, recent şi sistemul celulelor cromafine din tubul digestiv, alcătuind *sistemul de producere, de preluare şi de degradare al aminelor* (*Amine Production Uptake & Degradation*, APUD).

10.2.1. Hipofiza

Aceasta este o glandă de mărimea unei alune, situată în şeaua turcească la baza craniului, ce comunică cu porţiunea hipotalamică printr-un infundibul, care conţine vasele sistemului portal sanguin (al lui *Popa*), precum şi fibrele tractului supraoptic şi paraventricular. Atât din punct de vedere structural, cât şi funcţional, în hipofiză pot fi deosebiţi doi lobi (*anterior* şi *posterior*), despărţiţi de *lobul intermediar*. Pe baza caracterelor lor tinctoriale, celulele lobului anterior au fost caracterizate ca *cromofobe, acidofile* şi *bazofile*. Ulterior s-a constatat că indiferent de afinitatea lor faţă de coloranţi, fiecare hormon hipofizar este format dintr-o populaţie celulară deosebită. Ca urmare, aceste celule sunt denumite după hormonul produs – ACTH, STH, MSH etc. Cantitatea

în plasmă a acestor hormoni poate fi determinată cu ajutorul unor metode radioimune (*RIA*) sau imunoenzimatice (*ELISA*), deosebit de sensibile, exacte şi precise.

Lobul posterior al hipofizei conţine celule sub formă de pară, numite pituicite, care depozitează peptidele ciclice, *vasopresina* şi *ocitocina*, purtătoare de semnale, formate în hipotalamus. Comunicările intercelulare neurohipofizare reglatoare se manifestă prin fasciculele nervoase, pătrunse în hipofiză prin infundibul, sau prin neurocrinia unor mediatori, realizată pe calea spaţiilor interfasciculare sau prin hemocrinia acestora în sângele circulant, în vasele sistemului portal hipofizar.

10.2.2. Reglarea secreţiilor hormonale

Reglarea secreţiei hormonale a diferitelor glande endocrine subordonate hipofizei se realizează prin *mecanisme de cuplare inversă* (*feed-back*) mai mult sau mai puţin complicate. Starea funcţională a glandelor endocrine periferice este reflectată de cantitatea hormonilor secretaţi în sângele circulant. Scăderea cantităţii circulante a unui hormon acţionează în sensul stimulării biosintezei proprii, iar în caz contrar, în sensul inhibării. Aceste reacţii de cuplare inversă au loc în hipotalamus. Un grup de neuroni din această zonă au pe suprafaţa lor structuri receptoare specifice, care pot fixa în mod selectiv câte un fel de hormon produs de glandele endocrine periferice corespunzătoare. În cazul în care cantitatea circulantă a unui hormon periferic (de ex. a triiodotironinei) scade, neuronii hipotalamici respectivi produc şi eliberează în sânge un mediator stimulent, numit *factorul de eliberare a hormonului tireostimulator* (*Thyreoid Stimulating Hormone Releasing Factor*, TSHRF). Această structură tripeptidică, deosebit de simplă (*piroglutamil-histidil-prolin-amida*), ajungând pe cale sanguină în hipofiza anterioară stimulează secreţia hormonului tireotrop (TSH).

Alături de această *cuplare inversă pozitivă* mai sus prezentată, prin existenţa unor *factori inhibitori ai eliberării hormonilor* (*Release Inhibitory Hormone*, RIH), funcţionează şi *cuplări negative inverse*. Astfel, un tetradecapeptid cu două punţi disulfidice, numit *somatostatina* (GH-RIH sau STH-RIH) şi produs de unii neuroni ai hipotalamusului, pe de o parte inhibă în celulele corespunzătoare ale hipofizei eliberarea hormonului de creştere sau somatotrop (*Growth Hormone*, GH, respectiv *Somatotrop Hormone*, STH), pe de altă parte stimulează eliberarea insulinei şi a glucagonului din celulele β, respectiv α_2 ale insulelor Langerhans. Este de remarcat că somatostatina se produce şi în celulele insulelor Langerhans.

Majoritatea *hormonilor peptidici paracrini* (*gastrina, enterogastronul, colecistochinina, secretina, pancreozimina*, peptidul vasoactiv intestinal, VIP) se formează în unele celule speciale ale tubului digestiv şi acţionează în cadrul acestui sistem. Aceste peptide sunt prezente ca neurotransmiţători şi în

sistemul nervos central. În mod similar, *encefalinele* din grupa *endorfinelor*, care inhibă manifestarea senzaţiilor dureroase în centrii hipotalamici, la rândul lor au un efect stimulator şi asupra motilităţii intestinale. Printre primii *neurotransmiţători* identificaţi se află *acetilcolina, norepinefrina, epinefrina* şi *dopamina*. Norepinefrina şi epinefrina pot fi considerate atât mediatori, cât şi hormoni, deoarece participă atât la transmiterea influxului nervos în sinapsele simpatice, cât şi la manifestarea efectelor de la distanţă, fiind transportate prin sângele circulant.

10.2.3. Encefalinele

Encefalinele (*met-encefalina* şi *leu-encefalina*) sunt neuropeptide (pentapeptide) eliberate prin proteoliză din două proteine precursoare macromoleculare: *proencefalina-A şi B*. În structura proencefalinei-A, secvenţa met-encefalinei este cuprinsă de 6 ori, în cea a leu-encefalinei, însă, într-un singur exemplar. Molecula proencefalinei-B cuprinde numai 3 secvenţe de leu-encefalină şi nici una de met-encefalină.

În structura precursorilor, secvenţele encefalinelor sunt izolate prin câte doi aminoacizi: 2 - 2 lizine sau arginine, respectiv o lizină şi o arginină. Ca şi în cazul celorlalţi neurotransmiţători, neuropeptidele active se eliberează din precursori prin proteoliza realizată de enzime proteolitice, numite convertaze. Prin stimularea sau inhibarea medicamentoasă a activităţii acestor enzime a devenit posibilă influenţarea pentru scopuri terapeutice, intensificarea producţiei neurotransmiţătorilor peptidici.

10.2.4. Receptorii α şi ß

Noradrenalina, alături de rolul ei de neurotransmiţător manifestat la nivelul centrilor vegetativi, fiind transportat de sângele circulant, are şi efecte biologice generale asupra întregului organism. Pe baza manifestării acestor efecte biologice, Walter Bradford Cannon a formulat termenul *reacţiei de alarmă* (1915). Această reacţie se manifestă în urma unei acţiuni de agresiune, care declanşează o degajare masivă de noradrenalină din partea sistemului nervos central şi a medulosuprarenalei. Noradrenalina eliberată aduce organismul într-o stare corespunzătoare pentru luptă sau retragere (*fight or flight*).

Pentru identificarea mediatorilor sistemului nervos vegetativ, a *adrenalinei* şi a *acetilcolinei*, Henry H. Dale şi Otto Levy au fost laureaţi cu premiul Nobel (1936). Per H. Ahlquist a arătat, în 1948, că acţiunile biologice deosebite ale adrenalinei şi noradrenalinei pot fi explicate prin existenţa a două structuri aparte, α şi ß, ale receptorilor specifici pentru aceşti mediatori.

Excitarea receptorilor α transmite impulsuri inhibitoare, stimularea receptorilor β transmite impulsuri stimulatoare în interiorul celulelor excitate.

Se cunosc o serie întreagă de substanţe care stimulează sau inhibă în mod selectiv funcţionarea receptorilor adrenergici. Cele stimulatoare se numesc substanţe *simpaticomimetice*, cele inhibitoare, *simpaticolitice*. Pentru sinteza în laborator a primei substanţe inhibitoare a β-receptorilor, numită *propranolol*, Sir James Black a fost laureat cu premiul Nobel în medicină (1988).

Excitarea receptorilor α_1 ai fibrelor musculare netede ale vaselor mici determină contractarea lor şi ca urmare creşte presiunea arterială sistemică. Această creştere poate fi prevenită prin administrarea unor substanţe α-blocante, ca *fentolamina, dibenamina, fenoxibenzamina*. Excitarea receptorilor β_1 duce la creşterea frecvenţei cardiace, a receptorilor β_2 ai fibrelor musculare netede bronşice, produce dilatarea bronşiolelor. Prin administrarea stimulenţilor receptorilor β_2 (salbutamol, terbutalin) spasmul bronşic poate dispare; prin administrarea inhibitorilor receptorilor β_1 (propranolol, exprerenol, practolol, pindolol, timolol) poate fi redusă frecvenţa cardiacă şi presiunea arterială. Ţinând cont de faptul că fibrele musculare miocardice conţin receptori β_1, iar fibrele musculare netede bronşice conţin receptori β_2, s-a reuşit sinteza chimică a unor substanţe, care inhibă în mod selectiv receptorii β_1 ai miocardului, respectiv stimulează receptorii β_2 ai musculaturii netede a bronşiolelor.

Efectele neurotransmiţătorilor sunt limitate în timp şi spaţiu. Ei sunt produşi şi depozitaţi în butoanele terminaţiilor nervoase, se eliberează şi pătrund în spaţiul intersinaptic în momentul transmiterii influxului nervos de la membrana presinaptică la cea postsinaptică. În acest moment ei declanşează depolarizarea membranei postsinaptice şi deplasarea potenţialului de acţiune de-a lungul fibrei musculare efectoare. Acţionarea continuă a mediatorilor este însă împiedicată prin descompunerea lor enzimatică imediată (în cazul acetilcolinei de către enzima *colinesteraza*).

Transmiterea influxului nervos la celulele efectoare poate fi influenţată farmacologic prin mai multe mijloace. Unele medicamente stimulează sau inhibă sinteza mediatorului însuşi. Altele influenţează redepozitarea cantităţilor neconsumate ale mediatorului. Astfel, compuşii triciclici folosiţi în tratamentul stărilor depresive inhibă redepozitarea presinaptică a noradrenalinei şi a serotoninei. Prin aceasta, duc la creşterea cantităţii neurotransmiţătorului în spaţiul intersinaptic.

Funcţia enzimelor, care produc sau descompun adrenalina, are o contribuţie de bază la reglarea funcţiilor nervoase. Adrenalina eliberată în spaţiul intersinaptic se descompune de către enzima *monoaminooxidaza* (MAO) care îi limitează în timp şi spaţiu acţiunile. Substanţele care inhibă activitatea MAO (iproniazida) duc la creşterea cantităţii intrasinaptice a adrenalinei şi a altor monoamine. Acest efect stă la baza mecanismului de acţiune a substanţelor inhibitoare MAO în tratamentul stărilor depresive.

10.2.5. Mecanismul de acțiune a hormonilor steroizi

Prin acţiunile lor multiple metabolice şi funcţionale, hormonii steroizi ocupă un loc deosebit în funcţionarea sistemului endocrin al organismului. Acţiunile lor se deosebesc şi în funcţie de localizarea şi proprietăţile celulelor lor ţintă. Astfel, *cortizolul* inhibă consumul glucidic al celulelor; stimulează descompunerea proteinelor, inclusiv gluconeogeneza; formarea trigliceridelor şi a corpilor cetonici; reduce numărul limfocitelor T circulante; starea funcţională a macrofagelor şi a granulocitelor polimorfonucleare. *Aldosteronul*, în tubii renali distali, creşte reabsorbţia activă a sodiului, reabsorbţia pasivă a clorurilor şi a apei, precum şi eliminarea potasiului. Efectele complexe ale hormonilor sexuali feminini şi masculini se prezintă în cursul pubertăţii în manifestarea semnelor secundare ale sexualităţii.

Hormonii steroizi sunt transportaţi în plasmă sub formă legată de proteine transportoare specifice: cortizolul este vehiculat de *transcortina* (*Cortisol Binding Protein*, CBP), iar ceilalţi hormoni steroizi de *proteină fixatoare a hormonilor sexuali* (*Sex Hormone Binding Protein*, SHBP). Sub forma lor legată de proteine, hormonii steroizi intervin atât în reglarea centrală, cât şi în reglarea directă a secreţiei lor periferice: în cazul unui exces al hormonilor circulanţi, ei declanşează pe de o parte secreţia hipotalamică a inhibitorului eliberării ACTH (ACTH-RIH), iar pe de altă parte, vehiculul proteic saturat nu mai poate prelua de la glandele periferice cantităţile formate de hormoni. În lipsa unei capacităţi de depozitare pentru hormonii produşi în celulele producătoare, aceştia blochează printr-o cuplare inversă propria lor formare.

Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi este destul de complex. Fiind substanţe apolare, traversează uşor membrana celulară. În citoplasma celulelor ei sunt fixaţi de structuri proteinice receptoare specifice. Aceşti receptori sunt peptide monocatenare, cu masa moleculară de 85 000-89 000 d. Capătul apolar al receptorilor fixează hormonii; cel bazic, N-terminal, conţinând lizină, arginină şi histidină se cuplează cu ADN nuclear. Pentru manifestarea efectelor, complexele formate au nevoie de activare prin fosforilarea peptidului receptor de către o enzimă, *proteinkinaza*. Inactivarea complexelor se face prin defosforilarea lor de către o enzimă *fosfoproteinfosfataza*. Ionii molibdenici inhibă activitatea acestei enzime, ca urmare prelungesc activitatea hormonilor steroizi. În urma fosforilării lor, complexele receptor-hormon se transportă prin intermediul canalelor reticulului endoplasmatic în nucleu, unde se fixează de ADN. Această cuplare este inhibată în mod competitiv de vitamina B_6 (*piridoxalfosfatul*). Prin această *translocaţie* hormonii steroizi îşi exercită efectele asupra materialului genetic. Aceste acţiuni se manifestă fie printr-o depresare a unor gene temporar inactive, fie prin modificarea funcţiilor unor gene în acţiune. Moleculele hormonilor se eliberează din complexul fixat de ADN (şi sub formă liberă îşi

pierd activitatea), iar peptidele vehiculante se descompun. Schema mecanismului de acţiune a hormonilor steroizi este prezentată în figura 108.

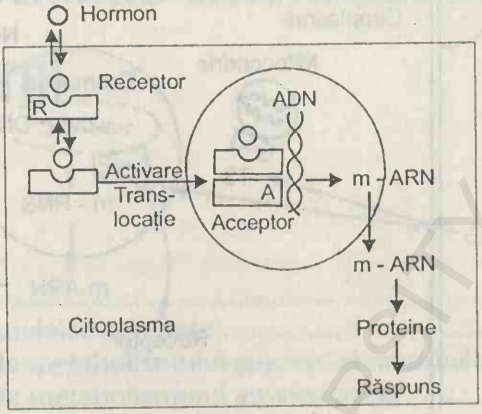


Fig. 108. Mecanismul de acţiune a hormonilor steroizi.

10.2.6. Mecanismul de acțiune a hormonilor tiroidieni

Hormonii tiroidieni iodaţi, *tetraiodtironina* (T_4) şi *triiodtironina* (T_3), sunt transportaţi în plasmă tot sub forma legată de o proteină transportoare. O cantitate mică rămâne totuşi nefixată, traversează membrana şi ajunge în citoplasma celulelor. Nici membrana, nici citoplasma nu dispun de receptori specifici pentru fixarea hormonilor tiroidieni. Astfel, ei se deplasează liber în canalele reticulului endoplasmatic, ajungând şi în nucleu. Nucleul însă conţine proteine receptoare, care fixează tironinele şi transmit mesajul lor purtat spre genele temporar inactive sau active.

La început s-a crezut că efectele biologice cunoscute ale hormonilor tiroidieni (creşterea consumului de oxigen, a metabolismului, a respiraţiei, a circulaţiei şi a excitabilităţii nervoase) se manifestă prin decuplarea în mitocondrii a oxidării biologice de fosforilare. Ulterior s-a constatat că în urma administrării hormonilor tiroidieni la animalele de experienţă creşte considerabil conţinutul enzimatic (dehidrogenaze, ATP-aza, citocromii, citocromoxidaza) al unor organe şi ţesuturi active (hepatocite şi fibre musculare). Această creştere se datorează unei intensificări a biosintezei proteinelor (enzimelor), deoarece prin inhibarea medicamentoasă a formării acestora, sau a ADN respectiv ARN, pe plan experimental se poate preveni manifestarea efectelor metabolice şi funcţionale ale hormonilor tiroidieni, administrate în exces. Mecanismul de acţiune a acestor hormoni este mult asemănător cu cel al factorilor de creştere. Schema mecanismului de acţiune a hormonilor tiroidieni este prezentată în figura 109.

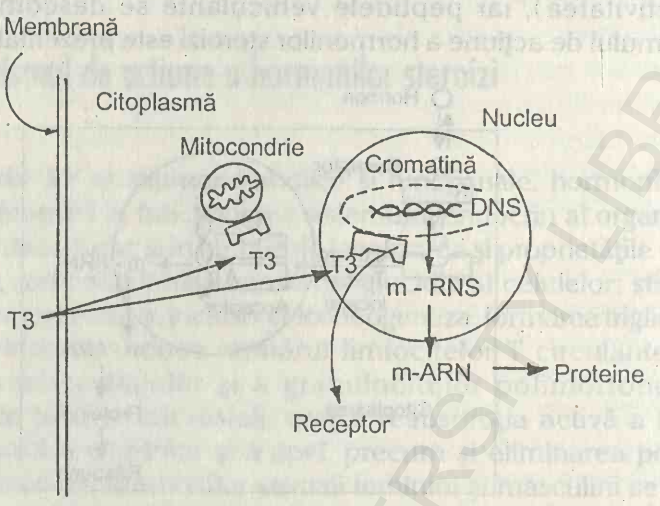


Fig. 109. Mecanismul de acţiune a hormonilor tiroidieni.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11 Patochimia sistemului nervos central

11.1. Neuronul 480
11.2. Metabolismul celulelor nervoase 484
11.2.1. Tulburările metabolismului glucidic al neuronilor 485
11.2.2. Tulburările metabolismului aminoacizilor 486
11.2.3. Tulburările metabolismului lipidic 488
11.2.4. Encefalopatiile metabolice, stări comatoase 489
11.3. Sinapsa 490
11.4. Neurotransmiţătorii şi receptorii 491
11.4.1. Receptorii de acetilcolină 493
11.4.2. Receptorii de catecolamine 493
11.4.3. Receptorii de serotonină 495
11.4.4. Receptorii de histamină 496
11.4.5. Neuropeptidele şi receptorii de peptide 497
11.4.6. Aminoacizii neurotransmiţători 499
11.4.7. Neurotransmiţătorii purinici şi receptorii lor 500
11.4.8. Neurotransmiţătorii şi receptorii inozitol fosfatici 501
11.4.9. Neurotransmiţătorii prostaglandinici şi leucotrienici 502
11.4.10. Patochimia funcţiilor nervoase superioare: gândirea, învăţarea, memoria 503
11.4.11. Tulburările neurotransmiţătorilor şi receptorilor. Patochimia stărilor psihotice 503
11.5. Circulaţia sistemului nervos central 505
11.6. Bolile sistemului nervos periferic 506
11.7. Patochimia şi explorarea de laborator a lichidului cefalorahidian .. 507

BCU IASI LIBRARY

Partea centrală a sistemului nervos reglează funcţiile organelor şi ţesuturilor, iar cea periferică recepţionează efectele interne şi externe, propagându-le în diferite centre reglatoare, care în urma prelucrării acestora, emit reacţii reflexe adecvate.

11. 1. Neuronul

Unitatea morfo-funcţională a sistemului nervos o constiutie *neuronul,* descris prima dată de Jan Evanghelista Purkyně în 1839, ca o celulă neurală având forma unei stele, cu numeroase prelungiri citoplasmatice. Alături de elemente structurale microscopice obişnuite ale celulelor (membrana celulară, ergastoplasma, microorgane, nucleu), elementele structurale deosebite ale neuronilor sunt prelungirile citoplasmatice, numite *dendrite,* precum şi câte un *axon* fibrilar de o lungime variabilă, înconjurate sau lipsite de un înveliş mielinic (teaca lui Schwann). Neuronii nu se multiplică, numărul lor definitiv (cca. 20 miliarde) se stabileşte în scurt timp după naştere. Din acest număr se degradează şi se consumă zilnic cca. 20.000 de neuroni. În unele condiţii, măsura şi viteza acestei degradări se poate amplifica cu înaintarea în vârstă, ducând la manifestarea *demenţei senile* (boala *Alzheimer).* Fig. nr. 110 prezintă schematic elementele structurale componente ale SNS şi interrelaţiile lor.

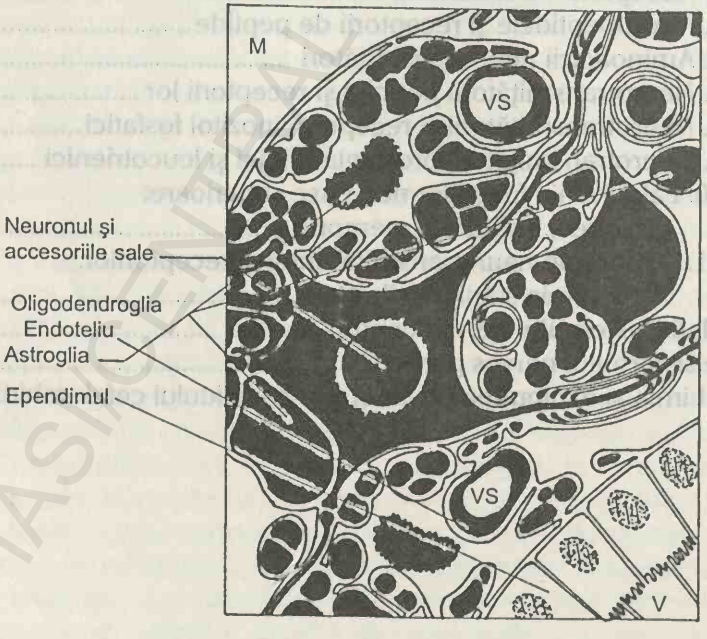


Fig. 110. Elementele structurale principale ale sistemului nervos central şi interelaţiile lor (M: partea meningeală, VS: vas sanguin , V: partea ventriculară)

Dendritele de obicei pornesc separat, pe puncte de origine diferite de la suprafaţa neuronului. Sunt însă cazuri în care se desprinde o singură dendrită, ramificându-se ulterior. Alături de constituenţii citoplasmatici, dendritele mai conţin şi câţiva corpusculi *Nissl* şi neurofilamente. Ele conduc influxul în sens *centripet* , adică de la periferie spre pericarion.

Axonul este prelungirea neuronală cu structură şi funcţii, care conduce influxul nervos de la pericarion spre periferie, adică în sens centrifugal. Din punct de vedere morfofuncţional, se pot deosebi 4 porţiuni ale neuronului:

- *porţiunea de origine,* având câţiva componenţi structurali citoplasmatici aşezaţi întâmplător;
- *porţiunea de desprindere,* cu aranjarea în sens longitudinal a componenţilor structurale;
- *axonul* propriu zis;
- *arborizaţia terminală,* cu îngroşarea buloasă a capetelor, numite *sinaptosoni.*

În granulele *sinaptosonilor* se depozitează mediatorul (*neurotrasmiţătorul)* , care realizează trasmiterea influxului nervos pe organul-ţintă, iar învelişul lor formează membrana presinaptică. Axonul este căptuşit pe întreaga lui de lungime de o membrană lipidică, numită *axolema.* Unele fibre nervoase din sistemul nervos central şi periferic sunt învelite şi de un strat lipoprotidic gros, format de *mielină.* Teaca mielinică conţine numeroase îngustări *Ranvier* cu mai multe Na^+ şi cu rol substanţial în *propagarea saltatorie a impulsurilor.*

Alături de nenumăraţii neuroni, sistemul nervos central mai conţine şi o serie de elemente celulare de susţinere, care alcătuiesc *nevroglia.* Aceste celule au fost descrise şi denumite de Rudolf Ludwig Karl Virchow în 1846, ca nişte elemente sub formă de păianjen, cu mai multe prelungiri fine. Pe baza deosebirilor lor structurale şi funcţionale se pot deosebi 3 feluri de celule gliale:

- *astrocitele şi celule oligodendrogliei,* care sunt celulele dendritice de origine ectodermică şi fac parte din sistemul macrofag monocitar (SMM), alcătuind *macroglia* propriu-zisă;
- *celulele microgliale* de origine mezodermică, tot cu proprietăţi de endocitoză şi de participare la inflamaţii vasculare;
- *celulele ependimale* tot de origine ectodermică, formează învelişul interior al camerelor cerebrale şi al canalului ependimar;

Celulele gliale se deosebesc de neuroni şi prin faptul că nu formează sinapse, precum şi prin capacitatea lor de a se multiplica prin diviziune. Este de remarcat faptul că celulele gliale în general şi astrocitele în special formează o barieră activă între sistemul nervos central şi organism: pătrunderea în SNC sau ieşirea de acolo a oricărei substanţe se poate desfăşura exclusiv prin intermediul acestora.

Teaca mielinică a fibrelor nervoase din SNC este produsă de celulele oligodendrogliale, iar cea a fibrelor nervoase periferice, de celulele *Schwann.* Fibrele nervoase ce ies din SNC, la rădăcinile lor sunt înconjurate de un strat

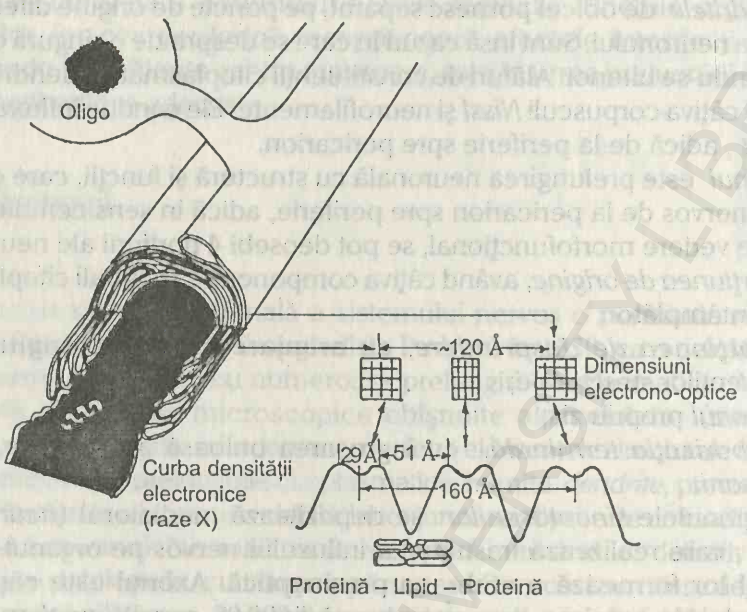


Fig.111. Dimensiunile exprimate în Å ale tecii mielinice şi schema aşezării acesteia în jurul unui axon din SNC.

subţire, format de celulele limitante ale astrogliei, care se continuă în *învelişul mielinic,* format din glucolipoproteine caracteristice, răsucite uneori în mai multe straturi. Acest înveliş este de fapt continuarea acelei structuri de membrană celulară, care corespunde suprafeţei *interioare* a canalelor ergastoplasmatice, care se formează într-un flux continuu (*membrane flow*) şi care la nivelul porilor exteriori ai aparatului *Golgi* se întoarce spre suprafaţa *exterioară* a celulelor. Fig. 111 prezintă schematic structura tecii mielinice a unui axon din SNC.

Teaca mielinică localizată între două îngustări *Ranvier* ale fibrelor nervoase din SNC (la distanţe de 10,6 nm) este formată dintr-o singură celulă oligodendroglială, iar cea a celor periferice (la distanţă de 11,9 nm) cuprinde o singură celulă *Schwann,* ambele fiind într-o strânsă legătură cu porţiunea respectivă a axonului. Cele din urmă sunt înconjurate de o atmosferă glucozaminoglicanică (*glucocalix)* de 20 – 30 nm grosime, au un nucleu alungit şi o ergastoplasmă bogată în microsomi.

Mielina extrasă din fibrele nervoase şi purificată conţine 30% proteine şi 70% lipide (fosfolipide şi diferite glucolipide). În ciuda abundenţei lipidelor, mielina prezintă o polaritate remarcabilă, putând fixa o cantitate de apă corespunzătoare proporţiei de 40% din masa proprie. Nu există nici o deosebire calitativă în compoziţia lipidică a mielinei de origine SNC şi periferică. În schimb, mielinele izolate din aceste fibre de origine diferită conţin *fosfolipoproteine (*PLP) şi *proteine de bază* (PB), substanţial deosebite. Marea majoritate a PB este alcătuită dintr-o *proteină proteolipidică* (proteina *Folch –Lees),* cu masa

moleculară de 30 kd şi solubilă în solvenţii organici (etanol) şi restul de un polipeptid, cu masa moleculară de 20 kd, numit DM –20.

Proteina principală de bază (*Major Basic Protein*, MBP) a mielinei are masa moleculară în medie de 18,5 kd. Este solubilă în apă şi poate fi extrasă din ţesutul nervos cu soluţii saline sau acidulate. MBP este localizată atât în cazul celulelor oligodendrogliale din SNC, cât şi a celor *Schwann* periferice în partea citoplasmatică a membranelor. Membrana celulelor oligodendrogliale conţin însă semnificativ mai multă PLP şi glucolipide, aceşti componenţi având şi o localizare deosebită în membrană (fig. 112.).

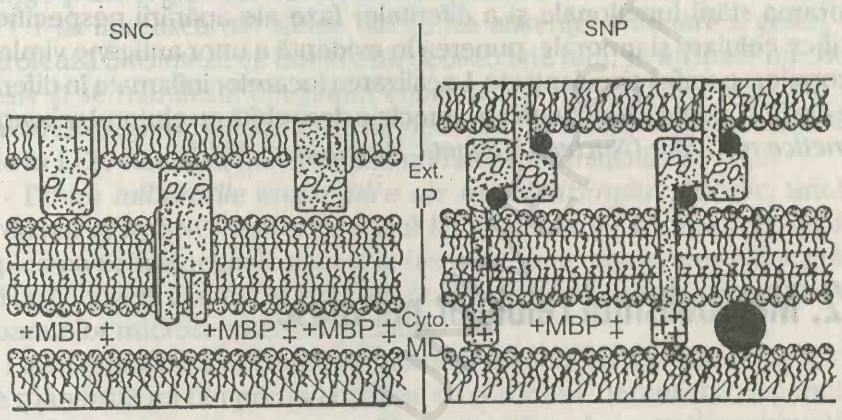


Fig.112. Schema organizării moleculare a mielinei în membranele axonilor din SNC şi SNP (PLP: fosfolipoproteine, MBP: proteina bazică majoră, P_0 şi P_2: proteine mielinice ale axonilor periferici).

Alături de PLP Şi MBP, teaca mielnică mai conţine şi alte proteine cu mase moleculare mai mari, ca enzime (de ex. *nucleotid fosfatdiesteraza ciclică,* CNP, şi *glucoproteina asociată mielinei* (*Myelin Associated Glucoprotein*, MAG). Este de remarcat, că MBP este puternic imunogenică: injectată la animalele de experienţă, provoacă un *răspuns imun celular specific* deosebit de puternic, ducând la manifestarea *„encefalomielitei alergice experimentale"* (*Experimental Allergic Encephalo-Myelitis, EAEM).*

Producţia deficitară (*hipomielinizarea)* sau patologică a mielinei (*dismielinizarea),* respectiv descompunerea ei (*demielinizarea)* influenţează substanţial funcţionarea fibrelor nervoase mielinice. Deşi bolile neurologice demielinizante se grupează în boli primare (ereditare) şi boli secundare (dobândite, infecţioase şi toxice), gravitatea acestora este determinată însă în toate cazurile de gradul şi extinderea demielinizării.

La om, boala demielinizantă cea mai caracteristică a SNC este *scleroza în plăci* sau *leuconevraxita*, care se manifestă prin distrugerea la nivelul multiplelor focare inflamate dispersate a substanţei albe. Deşi etiopatogenia bolii cuprinde o serie de factori ereditari şi din mediu, factorul cauzal principal îl constituie o serie de mecanisme imune şi autoimune. Pentru valabilitatea

acestei afirmaţii pledează observaţiile că boala se poate manifesta în urma unor infecţii virale (pojar, varicelă, paralizie infantilă) sau secundară unor vaccinări (antivariolic, antirabic, antiparalizie infantilă, antipojar etc), iar la animale de experienţă poate fi provocată printr-o singură inoculare parenterală a soluţiei de MBP, adică a proteinei principale a mielinei purificate. La început, diagnosticul clinic al bolii a fost bazat exclusiv pe examenul fizic al bolnavilor, precum şi pe unele examinări nespecifice de laborator. În momentul actual însă, atât pentru diagnosticarea, cât şi pentru aprecierea gravităţii şi evoluţiei bolii stau la dispoziţie o serie de metode de laborator sensibile şi exacte, ca identificarea haplotipurilor de histocompatibilitate, explorarea stării funcţionale şi a diferitelor faze ale apărării nespecifice şi specifice celulare şi umorale, punerea în evidenţă a unor antigene virale şi a anticorpilor specifici circulanţi etc. Localizarea focarelor inflamate în diferitele zone ale SNC poate fi efectuată cu o precizie deosebită cu ajutorul *rezonanţei magnetice nucleare (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)*

11.2. Metabolismul celulelor nervoase

Metabolismul celulelor fără funcţii nervoase specifice se desfăşoară în mod similar ca şi în celulele din celelalte organe şi ţesuturi ale oraganismului. În schimb, structurile necesare pentru efectuarea funcţiilor multiple şi deosebit de diferenţiate ale neuronilor ocupă marea majoritate a spaţiului intracelular. Astfel, structurilor obişnuite pentru eliberarea şi depozitarea energiei nu le rămâne decât un fragment minim al acestuia. În felul acesta se explică dependenţa mare a neuronilor de aportul substanţelor nutritive prin sângele circulant, necesităţile energetice fiind acoperite prin metabolizarea aproape simultană a acestora, cu posibilitatea formării unor rezerve energetice reduse, suficiente doar pentru câteva secunde. Din acest motiv, neuronii sunt deosebit de sensibili la orice deviere produsă pe plan ereditar sau dobândită de la starea metabolică normală. Ca urmare, fiecare tulburare a circulaţie craniene (ischemie, hipoxie) poate duce la manifestarea unor leziuni structurale mai mult sau mai puţin grave (hemoragia cerebrală, infarctul cerebral) urmate de tulburări funcţionale corespunzătoare.

Sursa energetică principală a neuronilor este *glucoza,* care, din cauza conţinutului redus în glicogen al neuronilor, este asigurată prin circulaţie. Neuronii extrag în SNC cca. 10% din glucoza sângelui circulant. Glucoza se descompune atât prin calea anaerobă a fermentaţiei, cât şi prin oxidare directă în şuntul pentozofosfatic. Este de remarcat că în neuroni are loc într-o măsură mai limitată şi descompunerea oxidativă a corpilor cetonici. Scăderea glicemiei sub valoarea de 2,5 mmol/l produce o stare de excitaţie, apoi convulsii şi apoi pierderea cunoştinţei (*comă hipoglicemică*).

11.2.1. Tulburările metabolismului glucidic al neuronilor

Tulburările metabolismului glucidic al neuronilor se pot manifesta din următoarele motive principale:

- *Scăderea transportului glucozei peste bariera hemato-encefalică:*

Glucoza din sânge este transportată peste membranele capilarelor din plexurile coroide de către o *proteină transportoare de glucoză* (GLUT 1). În condiţiile unei circulaţii cerebrale normale, această proteină este prezentă în sânge şi astfel glucoza traversează normal bariera. Rareori se întâmplă ca GLUT 1 să lipsească din sânge din cauze absenţei ereditare a genei, care controlează biosinteza ei. Boala este deosebit de rară, se trasmite autosomal recesiv şi se manifestă din prima copilărie, cu stări spastice repetate şi cu retardarea creşterii. Glicorahia este deosebit de scăzută, cantitatea acidului lactic în LCR este însă normală sau numai nesemnificativ deviată.

- Dintre *tulburările enzimatice ale metabolismului glucidic,* unele se manifestă şi în SNC. Astfel în cazul *lipsei ereditare a maltazei acide,* în citoplasma celulelor gliale apar granule mari, iar în cea a neuronilor, granule mici de glicogen. Granulele sunt PAS pozitive şi se descompun în urma tratării preparatelor microscopice cu amilază.

Lipsa ereditară a enzimei *fosfoglicerat kinază* apare relativ mai frecvent şi se manifestă tot din prima copilărie cu o anemie hemolitică mai mult sau mai puţin accentuată, cu spasmofilie epileptiformă şi retardare mintală.

În *boala Lafora* se formează un polimer glucidic neobişnuit *(poliglucozan),* cu o structură similară amilopectinei, care se depune sub forma unor granule bazofile şi PAS pozitive *(corpusculii lui Lafora)* în citoplasma celulelor hepatice, a neuronilor şi a elementelor gliale centrale şi periferice. Boala debutează la vârsta de 50–60 de ani, progresează cu parestezii şi demenţă progresivă cu evoluţie fatală în 3-30 de ani.

- *Tulburările sistemice ale metabolismului glucidic,* afectând glicogenogeneza şi/sau gluconeogeneza, se manifestă în mod similar şi în diferitele porţiuni ale sistemului nervos. Semnul cel mai caracteristic al acestor tulburări îl constituie *hipoglicemia,* care în urma instalării stării de excitaţie sau letargice, a crampelor musculare şi a comei hipoglicemice, poate duce la apariţia unor leziuni structurale grave ale SNC, urmate de tulburări funcţionale consecutive.

La bolnavii cu *glicogenoza de tipul I* (boala *Gierke*), cauza hipoglicemiei o constituie lipsa ereditară a enzimei *glucozo – 6 - fosfat fosfatază.* În cazul lipsei enzimei *fructoză - 1,6 - difosfat fosfatază*, la fel ca şi în cazul lipsei enzimei *piruvat carboxilază* sau a *biotinei* , hipoglicemia severă este asociată cu o acidoză metabolică gravă, cu tahicardie, aritmie şi comă terminală.

Din cauza lipsei ereditare a unor enzime implicate în metabolismul glucozamino-glicanelor şi a lipidelor complexe, în neuroni se pot acumula diferiţi polimeri ai unor glucide, ca şi α- şi β- manoza, α-fucoza, acidul

neuraminic sau glucolipide, ducând la manifestarea unor *tezaurismoze* mai mult sau mai puţin grave, prezentate în tabelele 38. şi 39.

Tabelul 38

Enzimele lizosomiale deficitare şi tezaurismozele glucozaminoglicanice şi glucoproteinice respective, manifestate la nivelul SNC

Nr.	Denumirea tezaurismozei	Enzima lipsă din lizosomi
1.	α - manozidoza	a - manozidoza
2.	β - manozidoza	b - manozidaza
3.	α- fucozidoza	a- fucozidaza
4.	sialodoza (mucolipidoza I)	a- neuraminidaza (sialidaza)
5.	boala celulelor I (mucolipidoza II)	UDP - N - acetil- glucozamina - P - transferaza
6.	pseudodistrofia Hunter (mucolipidoza III)	——— „———

Tabelul 39

Enzimele lizosomiale deficitare şi tezaurismozele mucopolizaharidice (MPZ) respective, manifestate la nivelul SNC

Nr.	Denumirea tezaurismozei	Enzima lipsă din lizosomi
1.	Sindromul Hurler – Scheie (MPZ I şi V)	α - iduronidaza
2.	Sindromul Hunter (MPZ II)	α - iduronat -sulfataza
3.	Boala Sanfilippo (MPZ III, tipurile A,B,C,D)	heparan –N-sulfataza, N-acetilglucozaminidaza
4.	Boala Morquio (MPZ IV, tipurile A,B)	N - acetil-galactozamină-sulfatază β- galactozidaza
5.	Boala Maroteaux- Lamy (MPZ VI)	aril - sulfataza B
6.	Lipsa β- glucuronidazei (MPZ VII)	β - glucuronidaza

11.2.2. Tulburările metabolismului aminoacizilor

Metabolismul aminoacizilor are 3 aspecte principale: a) cuprinderea lor în *structura proteinelor;* b) transformarea lor în *hormoni* sau *neurotrasmiteri* şi c) folosirea lor prin oxidare ca *surse energetice*, în urma transaminării,

respectiv dezaminării. Lipsa congenitală a unor enzime din aceste transformări poate afecta pe oricare din ele; totuşi, din punct de vedere neuropatologic, tulburările degradării oxidative ale aminoacizilor sunt cele mai importante.

În cazul funcţionării insuficiente a *ciclului ureei,* de ex. în stări de insuficienţă hepatică gravă (intoxicaţii, ciroză), amoniacul eliberat în cursul dezaminării oxidative a aminoacizilor nu se neutralizează şi acumulându-se, provoacă o intoxicaţie din ce în ce mai gravă a organismului, inclusiv a SNC. În cazul în care amoniemia depăşeşte valoarea de 1 mM/l (17 g/l) se manifestă o comă din ce în ce mai adâncă şi gravă. În schimb, din cauza unei enzime lipsă, nici nu porneşte sau se întrerupe undeva secvenţa reacţiilor de metabolizare ale unui aminoacid. Din cauza deficitului enzimatic creşte continuu cantitatea aminoacidului sau a produsului lui intermediar, care se elimină în exces prin urină, ducând la manifestarea diferitelor *aminoacidurii.* Tabelul nr. 40 prezintă natura tulburării metabolice şi principalele simptome ale aminoaciduriilor ereditare mai frecvent întâlnite.

Tabelul 40

Natura tulburărilor metabolice şi principalele simptome ale unor aminoacidurii mai importante

Nr.	Denumirea:	Tulburarea metabolică	Simptome
1.	Boala *maple syrup*	lipsa descompunerii aminoacizilor cu catena ramificată	Vărsături, spasme, comă
2.	Aminoaciduria cu catene ramificate	aceeaşi (ac. izovalerianic, metilmalinic, propionic)	aceleaşi, cu acidoză metabolică
3.	Glutaraturia (tip I)	oxidarea insuficientă a glutaratului	sindrom cerebelar grav
4.	Glutaraturie (tip II)	lipsă de FAD	convulsii letale
5.	Fenilcetonuria	lipsa fenilalanin-hidroxilazei	oligofrenie
6.	Hiperglicemie acetogenă	deficitul enzimatic al degradării glicinei	convulsii letale
7	Homocistinurie	lipsa cistationin-sintetazei	tromboembolii, oligofrenie
8.	Hiperamoniemie	tulburările ciclului ureei	convulsii, comă letală
9.	Abiotinemia	lipsa carboxilării acizilor organici	hipotensiune, ataxie, acidoză metabolică, comă
10.	Aglutationemia	lipsa glutation-sintetazei	degenerescenţă spinocerebelară, oligofrenie, cataractă, hemoliză, hipotensiune, ataxie, oligofrenie
11.	Absenţa GABA	lipsa sucinat-dehidrogenazei	hipotensiune, ataxie, oligofrenie
12.	Boala *Canavan*	lipsa N-acetil-aspartat-ciclazei	demielinizarea infantilă rapidă

11.2.3. Tulburările metabolismului lipidic

Metabolismul lipidic al celulelor nervoase este deosebit de activ. Alături de folosirea ca surse energetice a acizilor graşi şi a corpilor cetonici, ele sunt capabile să producă o serie întreagă de lipide complexe, ca fosfolipide, inozitol fosfaţi, cerebrozide, gangliozide, sfingolipide etc. Din acest motiv, la fel de variate sunt şi tulburările solitare şi combinate ale metabolizării acestora, manifestate în SNC.

a) În *lipsa ereditară a carnitinei* este imposibilă oxidarea acizilor graşi lungi catenari, care pot traversa membrana externă mitocondrială numai sub forma combinată cu carnitină. *Forma musculară* a bolii se manifestă cu slăbiciune musculară şi dureri musculare la efort, precum şi în urma consumării grăsimilor. În cazul *lipsei generale a carnitinei,* simptomele bolii (coma hipoglicemică, sindromul *Reye)* apar încă din copilărie. Intensitatea lor poate fi parţial redusă prin administrarea carnitinei şi scoaterea din alimentaţie a grăsimilor conţinând acizi graşi lungi catenari.

B) Lipsa unor enzime hidrolitice ale lizosomilor şi a peroxisomilor, mai ales a sfingolipidelor este în mod similar cauza multor tezaurismoze. Principalele reprezentante ale acestora, precum şi enzimele lizosomiale, respectiv peroxisomiale lipsite pe plan ereditar, sunt reprezentate în tabelul 41., respectiv 42.

Tabelul 41

Tezaurismozele SNC cauzate de lipsa ereditară a unor enzime lizosomiale

Nr.	Denumirea bolii	Enzima lipsă
1.	Boala Farber (lipogranulomatoza)	ceramidaza
2.	Boala Niemann-Pick (tipul A şi B)	sfingomielinaza
3.	Boala Gaucher	glucozil-ceramidaza
4.	Boala Krabbe (sferocitoza leucodistrofică)	galactozil-ceramidaza
5.	Boala Fabry (leucodistrofia metacromazică)	aril-sulfataza (sulfatidaza)
6.	Gangliozidoza G_{M1}	β- galactozidaza
7.	Boala Tay-Sachs	β-hexozaminidaza (subunitatea α)
8.	Boala Sandhoff	β-hexozaminidaza (subunitatea β)
9.	Galactozidoza	lipsa proteinei protectoare

Tabelul 42

Simptomele bolii ereditare manifestate în urma lipsei ereditare a peroxisomilor sau a unor enzime peroxisomiale

Nr.	Denumirea	Starea peroxisomilor, enzima lipsă	Simptome
1.	Boala Zellweger	lipsa totală	spasme, dischinezie, ciroză hepatică
2.	Leucodistrofia sugarului	scădere numerică	similare, demielinizare
3.	Leucodistrofia legată de X	funcţii scăzute	Tulburări vizuale, demielinizare
4.	Boala Refsum	lipsa fitanat-reductazei	ataxie, retinită pigmentoasă

11.2.4. Encefalopatiile metabolice, stări comatoase

Fiecare stare patologică, care duce la modificarea sau întreruperea desfăşurării normale a proceselor metabolice a celulelor nervoase, duce la manifestarea tulburărilor de conştiinţă sau la pierderea cunoştinţei, la comă. Tulburarea metabolică cerebrală poate fi acută sau cronică, cauzând modificarea reversibilă sau definitivă a funcţiilor neuronale, indiferent de originea lor; ea duce la manifestarea mai mult sau mai puţin severă a leziunilor structurale şi a tulburărilor funcţionale respective. Dintre tulburările metabolice cerebrale, cele mai importante sunt *encefalopatiile hepatice, hipoxice, respiratorii, hipoglicemice şi uremice.*

Spre deosebire de encefalopatiile toxice, care dăunează în mod direct neuronilor, în cursul comei de hipoxie se instalează tulburarea funcţională complexă a glutamat receptorilor, a homeostaziei calciului intracelular şi a inozitol fosfatidelor (fig. 113). Din această cauză, la unii bolnavi hemodializaţi cu insuficienţa renală cronică, poate să se manifeste o *encefalopatie după hemodializă.* Cauzele acestei boli au fost atribuite iniţial efectelor toxice ale hidroxidului de aluminiu eluat în cursul hemodializei din piesele aparatului de hemodializă. Este mult mai verosimil însă că encefalopatia după hemodializă este cauzată de *acidoza metabolică,* care deşi este momentan compensată de capacitatea de tamponare a lichidului de dializă, nu poate fi menţinută pe termen lung, din cauza posibilităţii reduse a rinichilor de a forma bicarbonaţi, astfel reinstalându-se şi agravându-se repede acidoza metabolică precedentă în urma terminării dializei.

11.3. Sinapsa

Sinapsa reprezintă legătura funcţională situată între terminaţiile prelungirilor (*axonilor, dendritelor)* celulelor nervoase şi structurile biochimice receptoare sau efectoare (alţi neuroni, celule somatice) . Denumirea a fost creată şi folosită prima dată de Charles Scott Sherrington în 1897. Între *membrana presinaptică* a nodulului terminal şi cea *postsinaptică* a celulei efectoare, se situează *spaţiul sinaptic. Neurotrasmiţătorul (mediatorul)* ce realizează trasmiterea influxului nervos excitant sau inhibant la celula efectoare, este depozitată în granulele butoanelor presinaptice. În urma sosirii influxului nervos, neurotrasmiţătorul, eliberându-se din granule, ajunge în spaţiul sinaptic, unde se fixează pe receptorii membranei postsinapatice, declanşează reacţia efectoare stimulatoare sau inhibitoare, după care se descompune rapid pe cale enzimatică (fig. nr. 113).

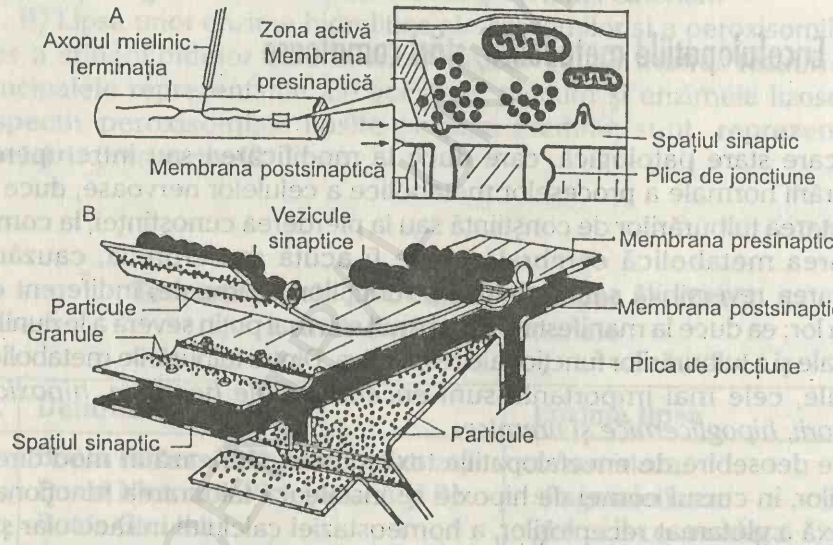


Fig. 113. Schema structurală a sinapsei. A: joncţiunea neuromusculară, B: modelul tridimensional al membranelor pre - şi postsinaptice.

În urma acţiunii mediatorului, în membranele postsinaptice se deschid *canale ionice.* Peste membranele celulare, impermeabile pentru apă şi electroliţi, în vederea menţinerii şi restabilirii potenţialului electrochimic, se desfăşoară prin diferite mecanisme (simport, antiport, transport facilitat şi activ) un transport ionic lent (fig. 114). Prin canalele deschise brusc în membranele postsinaptice are loc pătrunderea rapidă în celule şi ieşirea din ele a cantităţilor atât de însemnate ale diferiţilor ioni (Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}),

care provoacă modificarea bruscă a potenţialului electrochimic. În procesul transmiterii sinaptice a influxului nervos, ca activatori ai diferitelor enzime *protein-kinaze*, joacă un rol primordial ionii de calciu, fixaţi temporar de *calmodulină.*

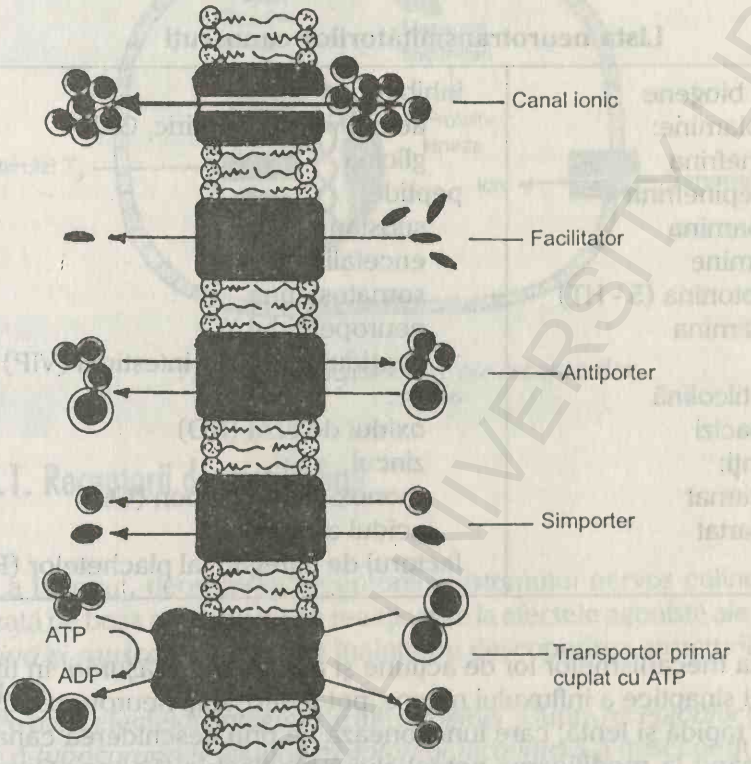


Fig. 114. Tipurile de transport transmembranal ale ionilor şi diferitelor substanţe.

11.4. Neurotransmiţătorii şi receptorii

Primul neurotrasmiţător identificat a fost *acetilcolina,* eliberată în sinapsele fibrelor nervoase parasimpatice (Wiliam Holman Hunt, 1901, Sir Henry Hollett Dale, 1902), urmată de descoperirea mediatorilor simpatici *adrenalina şi noradrenalina* (Herbert Albricht, Aoki Takamine, 1903, George Elliot, 1905). Ideea existenţei structurilor chimice receptoare, ce reacţionează în mod specific cu mediatorii, a fost lansată de John Newport Langley şi Sir

Henry Hollett Dale în 1909 şi confirmată de Otto Loewi în 1921. Lista neurotransmiţătorilor cunoscuţi până în prezent este prezentată în tabelul 43.

Tabelul 43

Lista neurotransmiţătorilor cunoscuţi

Amine biogene	inhibitori:
Catecolamine:	acidul γ -aminobutiric, GABA
epinefrina	glicina
norepinefrina	peptide:
dopamina	substanţa P
Indolamine	encefalinele
serotonina (5 - HT)	somatostatina
histamina	neuropeptidul Y
Esteri	peptidul vasoactiv intestinal (VIP)
acetilcolină	altele:
Aminoacizi	oxidul de azot (NO)
Excitanţi:	zincul
glutamat	monoxidul de carbon (CO)
aspartat	acidul arahidonic
	factorul de agregare al plachetelor (PAF)

Pe baza mecanismelor lor de acţiune şi a duratei desfăşurării în timp a transmiterii sinaptice a influxului nervos, pot fi deosebiţi neurotransmiţători cu acţiune rapidă şi lentă, care funcţionează fie prin deschiderea canalelor ionice, ducând la modificarea potenţialului bioelectric (*Voltage Operated Channels, VOC)*, fie prin excitarea unor receptori specifici (*Receptor Operated Channels, ROC),* fie prin punerea în funcţiune a unor mesageri secundari intracelulari.

Receptorii localizaţi în membrana celulară sau în citoplasmă transmit informaţia purtată de neurotransmiţători, fixaţi în mod specific pe suprafaţa externă sau în interiorul celulei, la nivelele structurilor efectoare. Pe baza mecanismului intim al acestor transmiteri se pot deosebi receptorii hormonali, peptidici, aminici care duc la deschiderea canalelor ionice şi la formarea mesagerilor secundari receptorii factorilor de deschidratarea canalelor ionice şi la formarea mesagerilor secundari, receptorii factorilor de creştere, care duc la activarea intramembranară a enzimei tirozin–kinază şi receptori intracitoplasmatici hormonali (steroidici, tiroidieni), prezentaţi schematic în fig. nr. 115.

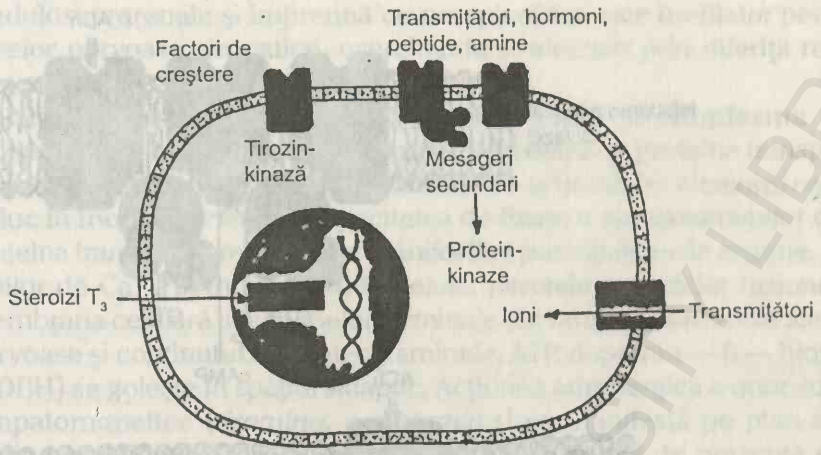


Fig. 115. Diferitele clase ale receptorilor.

11.4.1. Receptorii de acetilcolină

La început, deosebirea receptorilor sistemului nervos colinergic a fost realizată pe baza modului lor de reacţionare la efectele agoniste ale alcaloizilor *nicotină şi muscarină,* cu mult înainte de descoperirea structurii chimice a acestora.

Pe baza efectelor antagoniste ale *atropinei* asupra *receptorilor muscarinici* şi ale d-*tubocurarinei* asupra *receptorilor nicotinici* s-a descoperit ulterior că există mai multe feluri de receptori de acetilcoină. Dintre reprezentanţii acestora, *receptorii* N_1 se găsesc la nivelul conexiunilor neuromusculare, iar *receptorii* N_2 în ganglionii nervoşi. Receptorii acetilcolinici deosebiţi pot fi identificaţi cu ajutorul unor substanţe având structuri chimice deosebite, exercitând efecte agoniste sau antagoniste.

Efectele acetilcolinei fixate pe receptorii muscarinici de tipuri diferite (m AChR) se manifestă şi ele sub forme deosebite (fig.nr. 116).

Fixându-se receptorii M_1 şi M_2, acetilcolina activează subunitatea α a proteinei G_1, care inhibă funcţionarea enzimei *adelinat ciclază*. Stimularea receptorilor M_1, M_3 M_5 duce la fixarea GTP de către *proteinele G*, ca urmare a activării *adenilat ciclazei* şi în sfârşit, la deschiderea canalelor de K^+, în general, sau prin intermediul excitării receptorilor M_1 şi M_4 cu participarea proteinelor G_0 şi G_1 produce deschiderea în membrana celulară a canalelor K^+ şi Ca^{++}. Efectele de mesager primar ale acetilcolinei pot fi introduse în interiorul celulei şi transmise la sistemele enzimatice intracelulare ţintă prin intermediul mai multor mesageri secundari, ca *adenozin monofosfatul ciclic (cAMP), fosfatidil inozitol difosfat (PIP), fosfatidil inozitolul (PI), diacil glicerol (DAG), monoxidul de azot* (NO).

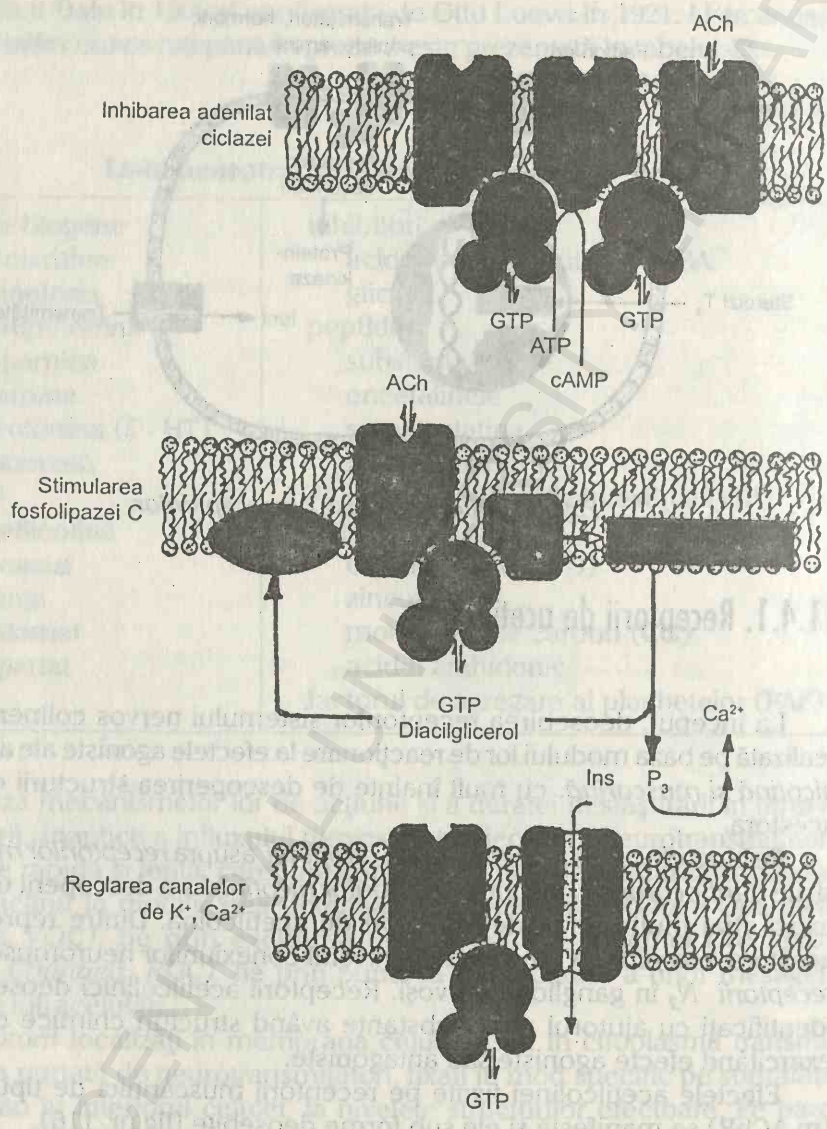


Fig. 116. Tipurile răspunsurilor biochimice primare, mediate prin receptori muscarinici de acetilcolină.

11.4.2. Receptorii de catecolamine

Dintre cei trei transmiţători, *dopamina*, *norepinefrina* şi *epinefrina*, dopamina este pe de o parte precursoarea celor două substanţe din urmă, cu excepţia efectelor sale directe asupra funcţiilor renale, pe de altă parte acţionează cu precădere în SNC. Epinefrina se formează şi în

medulosuprarenale şi împreună cu norepinefrina este mediator periferic al fibrelor nervoase simpatice, exercitându-şi efectele prin diferiţii receptori adrenergici.

Biosinteza catecolaminelor se desfăşoară în citoplasma celulor producătoare. La locurile lor de formare se fixează de proteine transportoare care le transportă la nişte granule bazofile de acumulare. Alcaloizii *reserpinei* reduc în mod caracteristic capacitatea de fixare a catecolaminelor de către proteina transportoare. În cursul manifestării potenţialului de acţiune, datorită ionilor de Ca^{++} pătrunşi rapid în celule, peretele granulelor fuzionează cu membrana celulară a butoanelor terminale din ramurile terminale ale fibrelor nervoase şi conţinutul lor (catecolaminele, ATP, dopamin — β — hidroxilaza = DBH) se goleşte în spaţiul sinaptic. Acţiunea adrenergică a unor substanţe simpatomimetice (*tiramina, amfetamina)* se manifestă pe plan indirect, nefiind condiţionată de influxul ionilor de Ca^{++}, nici de prezenţa enzimei DBH.

În urma desfăşurării transmiterii influxului, catecolaminele se decompun rapid pe cale enzimatică, prin acţiunea enzimelor *monoamino oxidaza* (MAO), respectiv *catecol-O-metil- transferaza* (COMT). Dopamina acţionează asupra receptorilor D_1 — (D_1 şi D_5) şi asupra celor asemănătoare D_2 (D_2, D_3 şi D_4), iar epinefrina stimulează receptorii α_1, α_2, şi β adrenergici.

Neurotransmiţătorul *ganglionilor bazali* (nucleului caudat, corpului striat, substanţei negre) este *dopamina*. Tulburările ei (producţie insuficientă, descompunere rapidă şi/sau excesivă, blocarea receptorilor, de ex. cu N-metil-4-fenil-1,2,3,6 –tetrahidro-piridina = MPTP) duc la manifestarea simptomelor *parkinsonismului,* boală descrisă de medicul londonez, James Parkinson în 1827 (*"The Shaking Palsy").* Dopamina nu poate traversa bariera hematoencefalică, însă precursoarea ei, *L – dioxi-fenilalanina (levodopa)* da, şi ca urmare această substanţă este folosită printre altele în tratamentul bolii parkinsoniene. Recent se semnalizează rezultate terapeutice promiţătoare, obţinute în urma implantării chirurgicale în creier a unor ţesuturi embrionare (ţesut medulo suprarenal, ţesut trunchiular cerebral) producătoare de dopamină.

11.4.3. Receptorii de serotonină

Efectul vasoconstrictor al *serotoninei* (5 – *hidroxi – triptaminei*) a fost demonstrată de I.H.Page în 1948. Reţeaua fină a neuronilor conţinând serotonină se situează în jurul şi de-a lungul liniei mediane a SNC, dar fibrele acestei reţele se găsesc în aproape toate părţile creierului. Serotonina se sintetizează în citoplasmă, se transportă sub formă legată de o proteină transportatoare la granulele de depozitare, reprezintă şi substanţa precursoare a hormonului *melatonina*.Excesul de serotonină este inactivat de enzima *monoaminooxidază (MAO)*, prin transformarea în 5 – *hidroxi acetataldehidă,*

apoi oxidat în acid 5 -hidroxi - indolacetic. Cantitatea în urina de 24 de ore a acestei substanţe este un bun indicator al stărilor de supraproducţie de serotonină.

Pe baza excitabilităţii şi inhibiţiei lor medicamentoase, receptorii de serotonină pot fi grupaţi în 4 grupe principale: receptorii de tipul 5-HT_1, (1A, 1B, 1C şi 1D), de tipul 5 – HT_2,) (D) de tipul 5 – HT_3 (M) şi de tipul 5 – HT_4. Mecanismele efectoare ale acestor receptori sunt prezentate în tabelul 44

Tabelul 44

Receptorii serotoninergici ai SNC şi mecanismele lor efectoare

Receptor	Mecanismul efector
5-HT_1	
1A	stimularea sau inhibarea cAMP, canale K^+
1B	inhibarea formării cAMP
1C	descompunerea fosfatidil inozitolului
1D	inhibarea formării cAMP
5 - HT_2 (D)	descompunerea fosfatidil inozitolului
5 - HT_3 (M)	deschiderea canalelor cationice
5 - HT_4	stimularea formării cAMP

11.4.4. Receptorii de histamină

Prezenţa histaminei în SNC şi cel periferic a fost constatată de H.Kwiatkowski în 1943 şi a fost confirmată prin punerea în evidenţă a efectelor antihistaminice ale unor medicamente psihotrope (*fenotiazina)*. Majoritatea neuronilor histaminoergici se localizează în nucleul tuberomamilar şi în partea posterioară a hipotalamusului. Dat fiind că traversarea barierei hemoencefalice de către histamină este deficitară, ea se formează local în fibrele nervoase din histidină, sub acţiunea enzimei *histidin decarboxilază* şi se descompune de către enzima *histamin metil-transferaza,* transformându-se în acid *imidazolil acetic.*

Structura celor două tipuri de receptori histaminici (H_1şi H_2) este apropiată structurii receptorilor muscarinici de acetilcolină. Receptorii H_1 excitanţi funcţionează cu multiple mecanisme (proteine G, activarea adenilat – sau a guanilat ciclazelor), folosesc multiple tipuri de mesageri secundari (cAMP, cGMP, ITP, DAG, Ca^{++}) şi sunt localizaţi în hipocamp, nucleul caudat, putamen şi în regiunea corticală cerebrală. Receptorii H_2 funcţionează prin proteina G şi adenilatciclază, exercită atât efecte stimulatoare cât şi inhibitoare şi se găsesc în primul rând în ganglionii bazali. Neuronii histaminoergici joacă un rol important în reglarea unor funcţii vegetative (digestive, circulatorii) prin influenţarea biosintezei unor peptide purtătoare de semnale (factori de eliberare, ca CTRF, LTH, ADH) şi în reglarea funcţiilor unor glande endocrine.

11.4.5. Neuropeptidele şi receptorii de peptide

Funcţiile neurotransmiţătoare exercitate asupra unor structuri receptoare de membrană au fost semnalate de B. Scharrer în 1978. Printre acestea au fost întâi descoperite *endorfinele* şi *encefalinele.* Ulterior a devenit clar că o serie de peptide secretate în mod paracrinic, având efecte biologice locale asupra unor organe, se găsesc şi în SNC, exercitând funcţii neurotransmiţătoare. S-a constatat că neuropeptidele se formează în comun, structurile lor fiind cuprinse în moleculele unor proteine precursoare mari, din care se eliberează succesiv prin proteoliză. Şi neuropeptidele se depozitează în granulele de acumulare ale neuronilor, de unde se eliberează şi pătrund în spaţiul sinaptic în cursul trasmiterii influxului nervos. O porţiune a neuropeptidelor eliberate se fixează de receptorii membranei postsinaptice şi declanşează procesul de excitaţie. Partea nefixată a peptidelor active, prin orificiile bulelor deschise, reintră în axon, unde se transportă în sens opus (fig. 117.).

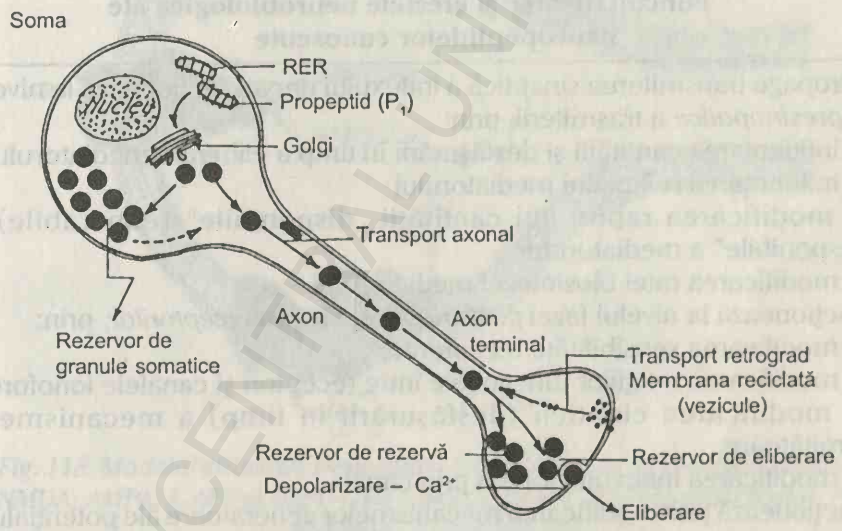


Fig. 117. Schema formării, propagării, menajării şi eliberării mediatorilor peptidici într-un neuron peptidergic.

Majoritatea receptorilor neuropeptidelor, prezentaţi în tabelul nr. 45, funcţionează prin intermediul proteinelor G şi adenilat ciclazei. Tabelul nr. 46 prezintă punctele de atac şi efectele neurobiologice ale acestora.

Tabelul 45

Neuropeptidele ce acţionează asupra receptorilor, funcţionând prin intermediul proteinelor G şi adenilat ciclazei

Angiotensina II	Ocitocina
Bradikinina	Neuropeptidul Y
Bombezina	Opiatele
Calcitonina	Parathormonul
Coriogonadotropina	Peptidul eliberator al somatotropinei (GHRH)
Endotelina	Peptidul eliberator al TSH (TSHRH)
Gastrina	Peptidul Intestinal Vasoactiv (VIP)
Hormonul adrenocorticotrop (ACTH)	Peptidul YY
Hormonul melanostimulator (MSH)	Somatostatina
Hormonul stimulator al foliculilor (FSH)	Substanţa K
Hormonul tireostimulatgor (TSH)	Substanţa P
Interleukina 8 (IL – 8)	Trombina
Neuromedina	Vasopresina

Tabelul 46

Punctul de atac şi efectele neurobiologice ale neuropeptidelor cunoscute

Propagă transmiterea sinaptică a influxului nervos, acţionează la nivelul fazei *presinapatice* a trasmiterii, prin:

- influenţarea cantităţii şi desfăşurării în timp a eliberării mediatorului
- influenţarea refluxului mediatorului
- modificarea raportului cantităţii „disponibile" (eliberabile) şi „nedisponibile" a mediatorului
- modificarea ratei biosintezei mediatorului.

Acţionează la nivelul fazei *postsinaptice*, asupra *receptorilor*, prin:

- modificarea sensibilităţii receptorilor,
- modificarea relaţiilor funcţionale între receptori şi canalele ionofore
- modificarea cineticii (desfăşurării în timp) a mecanismelor transmiţătoare
- modificarea influxului ionilor prin canale.

Acţionează prin modificarea mecanismelor generatoare ale potenţialului bioelectric, prin:

- modificarea proprietăţilor membranelor excitabile pe plan bioelectric
- intensitatea potenţailului bioelectric
- potenţialul de vârf („spike")
- rezistenţa internă a celulei
- capacitatea generatoare de potenţial bioelectric a membranelor
- rezistenţa de cuplaj a punctelor de contact ale conexiunilor
- funcţionarea pompelor bioelectrogene

Acţionează asupra factorilor implicaţi în procesul de excitaţie şi anume:

- asupra contracţiei musculare
- asupra unor procese metabolice.

11.4.6. Aminoacizii neurotransmiţători

Unii aminoacizi neurotransmiţători, ca *acidul aspartic şi acidul glutamic*, exercită efecte excitante; alţii însă, ca *glicina şi acidul γ- aminobuturic* (GABA), acţionează ca inhibitori în SNC.

O grupă numită NMDA (N-Metil-D-Aspartat) a *receptorilor glutamici* acţionează prin deschiderea canalelor de Ca^{++}, "operate de receptori" (ROC); o altă grupă, numită receptori L-AP4 (L-2 - amino 4 fosfonopropionat) funcţionează prin intermediul proteinelor G (fig. 118).

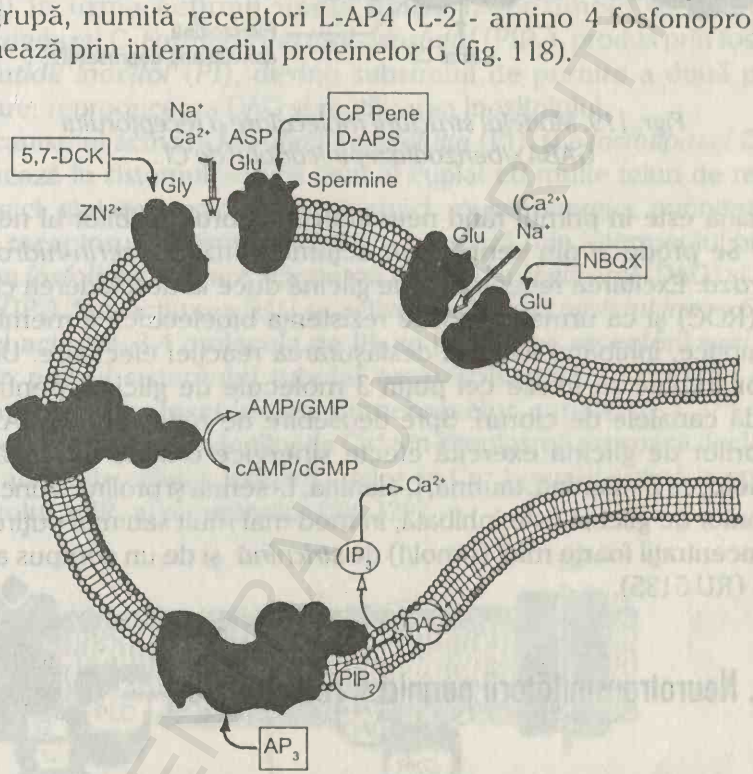
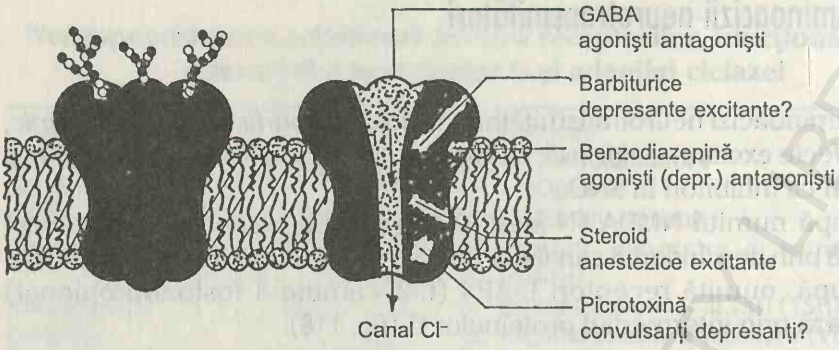


Fig. 118. Modelul structurii moleculare a celor 4 tipuri de receptori glutamici: NMDA; AMPA, L-AP4 şi ACPD (DAG: diacil-glicerol, IP_3: inozitoltrifosfat, PIP_2: fosfatidil-inozitol-bifosfat).

Dintre cei doi aminoacizi inhibitori (glicina şi GABA), neuronii dispunând de receptori GABA se găsesc în toate regiunile SNC. Cu ajutorul metodelor farmacologice pof fi deosebite două feluri aparte de receptori (A şi B) GABA – ergici. Receptorii $GABA_A$ benzodiazepina agonişti, reduc rezistenţa electrică a membranelor celulare prin deschiderea canalelor de Cl^-. Punctul fixator GABA al canalului operat prin receptori (ROC) se găseşte pe marginea exterioară, punctul fixator de benzodiazepină pe latura exterioară laterală, punctele fixatoare de barbituraţi, de steroizi şi de picrotoxină se localizează unul după altul, pe suprafaţa interioară a canalelor (fig. 119).

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI



Figr. 119. Modelul structurii moleculare a receptorului $GABA_A$/benzodiazepin/canalul de Cl .

Glicina este în primul rând neurotransmiţătorul inhibitor al neuronilor spinali. Se produce din serină, sub acţiunea enzimei *serin-hidroximetil-transferaza.* Excitarea receptorilor de glicină duce la deschiderea canalelor de Cl^- (ROC) şi ca urmare, reduce rezistenţa bioelectrică a membranelor postsinaptice, inhibând astfel şi desfăşurarea reacţiei efectoare. Un singur receptor trebuie să fixeze cel puţin 3 molecule de glicină, pentru ca să deschidă canalele de cloruri. Spre deosebire de receptorii GABA, asupra receptorilor de glicină exercită efecte sinergice o serie întreagă de alţi aminoacizi, ca β - alanina, taurina, L-alanina, L- serina şi prolina. Funcţionarea receptorilor de glicină este inhibată, în mod mai mult sau mai puţin selectiv şi la concentraţii foarte mici (nmol/l) de *stricnină* şi de un compus amidină-sterolic (RU 5135).

11.4.7. Neurotransmiţătorii purinici şi receptorii lor

Receptorii ce fixează ATP şi ADP, compuşi de o deosebită importanţă pentru metabolismul energetic al organismului, se găsesc şi în membranele celulelor, situate în special pe suprafaţa exterioară a acestora. Pe suprafaţa interioară a membranelor enzima *adenilat ciclaza* dispune de capacitatea de fixare a ATP. Asupra acestor receptori acţionează o serie de alte substanţe cu structuri similare ca de ex. *adenozina* în mod agonist, *xantina* în mod antagonist. Traversarea mebranelor celulare de către purine este inhibată de *dipiridamol.*

Pe baza funcţiilor diferite, se pot deosebi două feluri de receptori de adenozină: A_1 şi A_2. Prin intermediul proteinei G, excitarea receptorilor A_1 inhibă excitarea receptorilor A_2, stimulează rata formării cAMP. Receptorii P_1 fixează ADP, cei P_2 fixează ATP. ATP eliberat la nivelul plăcilor nervoase vegetative (simpatice şi parasimpatice) funcţionează în rol de contransmiţător.

11.4.8. Neurotransmițătorii și receptorii inozitol fosfatici

Creşterea însemnată în felii de creier a ratei de fosforilare a unor fosfolipide în urma administării locale a substanţelor cu acţiune muscarinică, a fost semnalată de L.E. Hokin în 1953. Ulterior s-a descoperit că acest fenomen se datorează fosforilării în *difosfatidil inozitol difosfat* (PIP_2), precum şi a resintezei lui din produşii de degradare (de ex.diacil-glicerol, DAG) eliberaţi în urma acţiunii uneia dintre izoenzimele α, β sau γ ale fosfoinozitidazei C. *Fosfatidil inozitol difosfatul* (PIP_2), produs prin fosforilare din *fosfatidil inozitol* (*PI*), devine substratul de pornire a două procese secundare: reproducerea DAG şi reutilizarea inozitolului:

Mecanismul activării *fosfatidil inozitolului* (PI) şi a *fosfolipazei C* (PLC) funcţionează în sistemul nervos central cuplat cu multe feluri de receptori adrenergici, glutamatergici, histaminergici, muscarinergici, purinergici, etc. Fixat pe receptorul corespunzător, PIP_2 activează prin intermediul proteinei G enzima *fosfolipaza C* care scindează PIP_2 în *diacil glicerol* (DAG) şi *inozitol trifosfat* (IP_3). Sub acţiunea DAG se activează enzima *proteinkinaza C* (PKC). În cursul activării, 3-4 molecule de IP_3 se fixează pe receptorii specific IP_3, situaţi în pereţii sistemului tubular ergastoplasmatic. Excitarea acestor receptori duce la deschiderea numeroaselor canale de Ca^{++} (ROC). Pătrunderea abundentă a ionilor de Ca^{++} în citoplasmă provoacă declanşarea reacţiei adecvate celular. Influxul ionilor de Ca^{++} persistă până la epuizarea conţinutului în IP_3 al receptorilor (fig. 120).

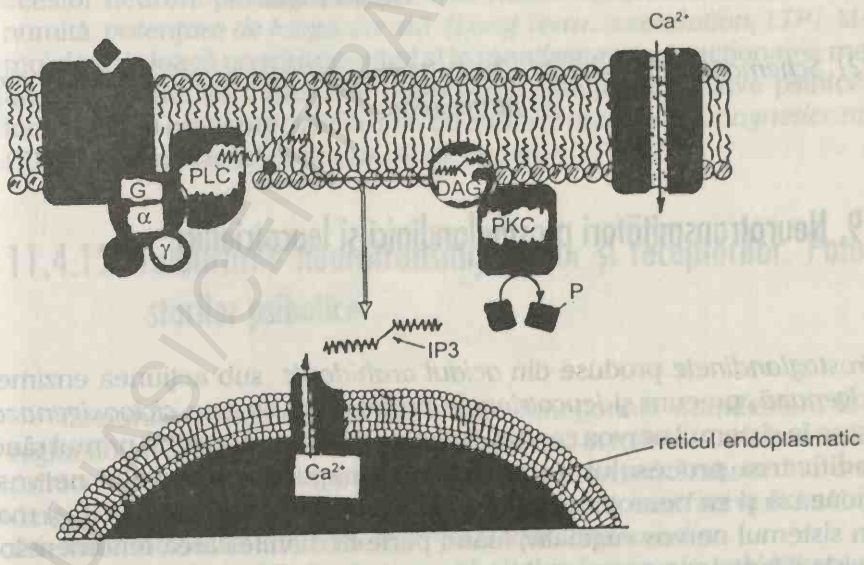


Fig. 120. Schema moleculară a cuplajului între excitarea receptorului, hidroliza inozitol fosfatului şi semnalizarea calcionică.

Calea finală comună a comunicărilor intracelulare o constituie fosforilarea unor proteine specifice, efectuată de enzimele *protein kinaze*, prin fosforilarea resturilor de *serină, treonină* sau de *tirozină* din lanţurile peptidice. În această secvenţă de reacţii (fig. 121), enzima activă este neutralizată prin hidroliză de o *protein fosfatază*. Neuronii din SNC conţin o serie întreagă de proteinkinaze puse în funcţiune de receptori şi mesageri secundari (cAMP, cGMP, DAG, Ca^{++}) dar şi independent de aceştia.

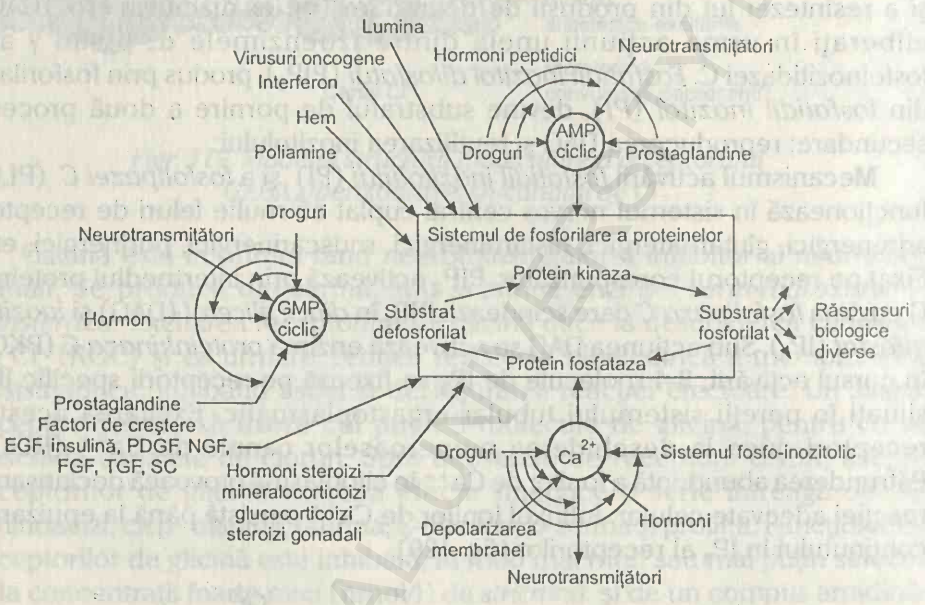


Fig. 121. Schema poziţiei centrale a fosforilării proteinelor în comunicările inter şi intracelulare.

11.4.9. Neurotransmiţători prostaglandinici şi leucotrienici

Prostaglandinele produse din *acidul arahidonic* sub acţiunea enzimei *lipooxigenază*, precum şi *leucotrienele* produse de enzima *ciclooxigenaza* se găsesc în sistemul nervos central. Rolul lor fiziologic constă în primul rând în modificarea procesului de trasmitere sinaptică a influxului nervos. Funcţionează şi ca neurotransmiţători adevăraţi (de ex. PGE_2 şi PGF_{2x}) mai ales în sistemul nervos vegetativ, luând parte la manifestarea fenomenelor reactive la diferitele procese patologice vasculare ale SNC (ca bolile vasculare, hemoragiile cerebrale, encefalopatiile, encefalitele).

11.4.10. Patochimia funcțiilor nervoase superioare: gândirea, învățarea, memoria

Funcţiile nervoase supreme se localizează în regiunile neocorticale, dar şi în regiunile mai puţin tinere ale filogenezei, ca hipocampul şi girusul cingular. În urma cercetărilor substanţiale din ultimele decenii, a devenit mai clar că experienţele, impresiile şi cunoştinţele necesare gândirii abstracte se depozitează la nivelul conexiunilor nervoase. Unitatea funcţională a învăţăturii şi a *memoriei imediate* (scurte) şi de *durată* o constituie *reflexul condiţionat*, adică reflexul elementar de acţiune şi reacţiune, în cursul căruia se manifestă simultan şi un alt stimul oarecare, prin care reacţia adecvată devine condiţionată.

Memoria este legată în mod evident de unele structuri deosebite; ca urmare se leagă şi de funcţionarea genelor, ce controlează biosinteza acestora. Această afirmaţie este susţinută de faptul prin care capacitatea însuşirii unor comportări învăţate de *Drosophyla melanogaster* poate fi modificată substanţial sau chiar oprită la descendenţi, prin lezarea locusurilor respective . Deşi fixarea în neuroni a impresiilor concrete şi abstracte memorizate are loc cu creşterea *biosintezei proteinelor*, controlate de acizii nucleici, până în momentul actual nu s-a reuşit transmiterea informaţiilor memorizate de la un neuron la altul cu ADN extras din aceştia.

În urma excitării neuronilor din zonele deosebite (CA 1) ale hipocampului de şobolan, la scurt timp în urma depolarizării neuronului postsinaptic, excitabilitatea creşte într-o măsură accentuată şi starea de hiperexcitabilitate acestor neuroni persistă timp de mai multe săptămâni. Această stare este numită *potenţare de lungă durată (Long Term Potentiation, LTP)*. Mecanismul descris joacă un rol important şi în manifestarea şi funcţionarea memoriei umane. Regiunile creierului, cuprinse în funcţiile cognitive psihice, pot fi localizate cu mare precizie în SNC cu ajutorul *rezonanţei magnetice nucleare* (RMN) şi a *tomografiei cu emisie de pozitroni* (PET).

11.4.12. Tulburările neurotransmițătorilor și receptorilor. Patochimia stărilor psihotice

Leziunile structurale şi tulburările funcţionale manifestate la nivelul regiunilor nervoase superioare ale omului duc la manifestarea unor disfuncţii psihice mai mult sau mai puţin accentuate, concretizându-se într-o serie de dereglări de comportament. Printre acestea, cele mai frecvent întâlnite sunt diferitele forme ale *schizofreniei* şi ale *stărilor depresive*.

Până nu demult, clasificarea diferitelor forme ale schizofreniei a fost posibilă numai pe baza formelor clinice de manifestare. Ulterior s-a constatat că în unele forme ale bolii predomină un exces al dopaminei, în altele apare deplasarea echilibrului între glutamat şi dopamină. Pe baza experienţelor

efectuate cu administrarea substanţelor halucinogene (*acidul lisergic*, LSD), este probabil că în etiopatogenia bolii joacă un rol însemnat *serotonina* şi unele neuropeptide *(endorfinele).*

În ambele forme ale *stărilor depresive,* adică în stările depresive şi în *psihoza maniaco depresivă* au fost puse în evidenţă tulburările mai multor mediatori, cum sunt catecolaminele, dopamina, serotonina, acetilcolina. Marea majoritate a medicamentelor antidepresive acţionează β- adrenergic şi îşi manifestă efectul terapeutic prin intermediul receptorilor de serotonină. Este deosebit de interesantă acţiunea antidepresivă a *sărurilor de litiu,* în special a *carbonatului de litiu.* Acest cation, cu o structură deosebit de simplă (dispunând de +3 protoni şi de 4 neutroni în nucleul atomic, precum de – 2 electroni pe orbitatul de K şi de – 1 electron pe cel de L) alături de faptul că acţionează asupra multor factori ai comunicărilor intracelulare (inhibând funcţiile proteinelor G, ale adenilat ciclazei, fosfatidil inozitolului şi fosforilarea proteinelor intracelulare), săpunurile sale, formate cu acizi graşi saturaţi lungi catenari, sunt mult mai puţin hidrosolubile, decât cele ale ionilor de sodiu şi mai ales de potasiu. Ca urmare, la bolnavii trataţi cu săruri de litiu, săpunurile mai rigide şi astfel mult mai lent difuzibile ale acestui cation simplu, acţionează ca *factori limitanţi* ai schimburilor de Na^+ şi K^+ la nivelul canalelor de potasiu, care asigură şi controlează influxul şi efluxul cationilor printr-o arhitectură moleculară deosebită, ce cuprinde o porţiune îngustă hidrofobă limitantă şi una hidrofilă mult mai largă a canalului (fig. 122). Această acţiune a ionilor de litiu a putut fi confirmată cu experienţa personală din 1995. Prin reducerea vitezei schimburilor cationice extra - şi intracelulare, săpunurile rigide de Li reduc şi viteza ieşirii ionilor de K^+ din celule (neuroni) şi alungesc durata menţinerii potenţialului de repaus. Dat fiind că doza terapeutică optimă a carbonatului de litiu asigură o litemie în jur de 1mmol/l, efectul limitant al ionilor de litiu asupra schimburilor ionice extra – şi intracelulare, trebuie să se manifeste la unul dintre 140 de ioni de Na^+ extracelulari, respectiv de ioni de K^+ intracelulari. Această proporţie mică se pare totuşi suficientă pentru a reduce într-o măsură eficientă rata de ieşire a ionilor de potasiu din neuroni.

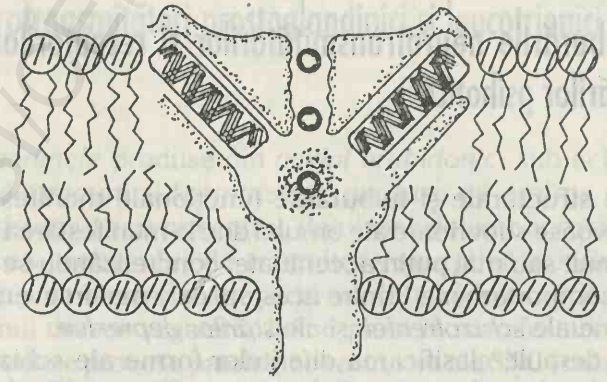


Fig. 122. Modelul structural molecular al canalului de K^+. Cele două coloane cu α- spirală în poziţie oblică reprezintă câte un peptid puternic hidrofil, care face posibilă traversarea canalului pentru K^+

11. 5. Circulația sistemului nervos central

Posibilitatea existenţei *barierei hemato-encefalice*, adică a conexiunii deosebite existente între circulaţia sistematică şi lichidul cefalo-rahidian a fost ridicată încă de la sfârşitul secolului nostru, când Paul Ehrlich a observat că soluţiile unor *coloranţi vitali* injectate intravenos la animale de experienţă pătrund în toate organele şi ţesuturile, cu excepţia creierului şi a măduvei spinării. Fenomenul nu a putut fi explicat printr-o "lipsă a capacităţii de fixare" a neuronilor pentru unii coloranţi, deoarece Ludwig Goldmann a demonstrat în 1913 că soluţia *albastrului tripan* administrată în lichidul cefalo-rahidian la animalele de experienţă colorează puternic elementele celulare ale ţesutului nervos, însă nu pătrunde în circulaţia sistemică. În mod similar, nici efectele toxice ale unor produşi naturali (acizi biliari), prezenţi în condiţii patologice în sânge, nu se manifestă în sistemul nervos central.

Elementele structurale ale barierei hemato-encefalice sunt alcătuie de celulele endoteliale şi de stratul înconjurător al celulelor ependimale din *plexurile coroide* ale ventriculelor cerebrale (fig. 123). Lipidele apolare traversează această barieră prin *difuziune* simplă, substanţele polare (glucoza) prin *trasport activ*, iar unele substanţe macromoleculare (proteine) prin *pinocitoză* mediată de receptorii micro- şi macrofagelor.

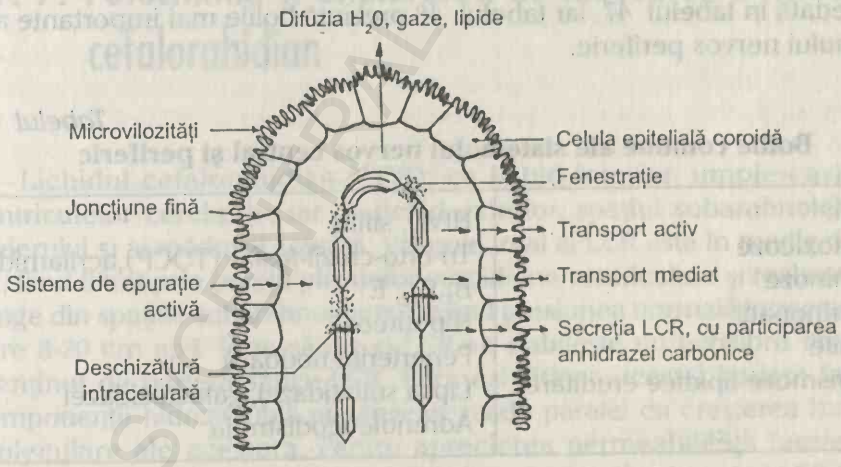


Fig. 123. Schema structurii şi funcţionării barierei hematoencefalice.

Lichidul cefalo-rahidian, într-un volum de 150–200 ml, nu reprezintă deci un ultrafiltrat simplu al plasmei, ci se produce pe baza unor funcţii celulare active. Din acest motiv, punerea în evidenţă a modificărilor patologice ale LCR este de o deosebită importanţă diagnostică. Lichidul cefalo-rahidian, produs continuu în ventriculele cerebrale, curge prin spaţiile subarahnoidale şi ajunge înapoi în circulaţie, traversând pereţii sinusurilor venoase şi ai venelor

epidurale.Orice modificare (inflamaţie, hemoragie, tumoră), care împiedică circulaţia normală a LCR, duce la creşterea volumului şi a presiunii sale (*hidrocefalie).*

11. 6. Bolile sistemului nervos periferic

Structura sistemului nervos periferic se deosebeşte de cea a sistemului nervos central. În timp ce în SNC fibrele nervoase sunt înconjurate de celulele oligodendrogliale, producătoare de mielină, în cazul fibrelor sistemului nervos periferic această funcţie este realizată de celulele *Schwann.* Din cauza lungimii lor deosebite, fibrele nervoase periferice sunt mult mai vulnerabile decât cele din SNC, leziunile lor ducând la *degenerări Waller,* şi /sau demielinizări segmentare. În contrast cu existenţa mai multor feluri de *proteine de bază* (BP) prezente în tecile mielinice ale fibrelor din SNC, teaca mielinică a fibrelor nervoase periferice conţine numai un sigur fel de proteină de bază (P_2) şi mult mai puţină *glucoproteină asociată* (MAG). În ciuda acestei deosebiri tructurale, unii factori nocivi pot provoca boli în ambele sisteme. Lista cauzelor şi a denumirii acestor boli comune este redată în tabelul 47, iar tabelul 48 prezintă bolile mai importante ale sistemului nervos periferic.

Tabelul 47

Bolile comune ale sistemului nervos central şi periferic

Infecţii:	HIVD, sifilis
Neurotoxicoze	Tri-orto-crezil-fosfat (TOCP),acrilamida
Avitaminoze	B_1,B_{12}, E
Endocrinopatii	Hipotireoză
Vasculite	Periarterita nodoasă
Tezaurismoze lipidice ereditare	Lipsa sulfatidazei, galactozidazei
	Adrenoleucodistrofia

Tabelul 48

Bolile mai importante ale sistemului nervos periferic

Infecţii	Lepra, difteria
Neurotoxine	Toxina botulinică, piridoxina, cisplatina
Imunopatii	Sindromul Guillain-Barré, Sindromul Lambert-Eaton, Macroglobulinemia Waldenström, formele neuropatice şi mielomatoase
Amiloidoza	

Boala Hirschprung
Boala Refsum
Neuropatiile ereditare combinate (motorii şi sensitive)
Neuropatia diabetică
Neurofibromatoza de tip I.

11. 7. Patochimia şi explorarea de laborator a lichidului cefalorahidian

Lichidul cefalorahidian (LCR), ca lichid interior, umple cavitatea ventriculelor cerebrale, iar ca lichid exterior, spaţiul subarahnoidian al creierului şi al măduvei spinării. Volumul total al LCR este în medie de 135 ml, fiind filtrat prin pereţii plexurilor coroidiene ventriculare şi reabsorbit în sânge din spaţiile subarahnoidiene, având presiunea normală intracraniană între 8-20 cm apă. Între sânge şi LCR se stabileşte un echilibru dinamic, menţinut de bariera sânge-LCR. Permeabilitatea acestei bariere faţă de componenţii hidrosolubili ai sângelui scade paralel cu creşterea maselor moleculare ale acestora. Pentru aprecierea permeabilităţii barierei se foloseşte valoarea raportului cantităţii albuminelor din plasmă şi LCR (R_{Alb}), care în condiţii fiziologice este totdeauna mai mic decât $7 \cdot 10^{-3}$. În meningite această valoare poate fi crescută chiar şi e 10-15 ori ($10 \cdot 10^{-3}$).

Compoziţia LCR

LCR normal este incolor şi transparent. Aspectul tulbure al LCR pledează pentru creşterea numărului leucocitelor (meningită). Numărul normal al leucocitelor este sub 3 celule/μl. Cu ajutorul frotiului colorat, efectuat din sedimentul LCR centrifugat, pot fi diferenţiate şi tipurile de leucocite.

O hemoragie se poate manifesta accidental în LCR din cauza unei recoltări greşite sau din motive obiective (hemoragie subarahnoidiană). În cazul în care puncţia s-a făcut cu câteva ore în urma manifestării hemoragiei, supernatantul obţinut după centrifugare prezintă o culoare galbenă (*xantocromie*). Creşterea cantităţii fibrinogenului duce la manifestarea unui cheag fin, filamentos (semnul meningitei tuberculoase).

Cantitatea substanţelor anorganice (ionilor) în LCR este foarte apropiată celor din plasmă. Cantitatea clorurilor în LCR poate fi scăzută în meningite. Cantitatea substanţelor organice micromoleculare este în general inferioară valorilor din plasmă, de ex. valoarea glicorahiei este cu 60% mai mică (2 mmol/l) decât valoarea glicemiei (5 mmol/l). Din acest motiv, paralel cu dozarea glicorahiei, se recomandă şi determinarea glicemiei. Spre deosebire de cele virale, în cursul meningitelor microbiene glicorahia scade într-o măsură considerabilă.

Cantitatea normală a acidului lactic în LCR este sub 2,2 mmol/l. Această cantitate creşte în cursul meningitelor microbiene, în urma hemoragiilor subarahnoidiene şi a atacurilor ischemice cerebrale.

Cantitatea normală a proteinelor în LCR este sub 0,5 g/l. Valoarea proteinorahiei creşte în inflamaţii. În condiţii fiziologice, 82% din proteinele LCR sunt de origine plasmatică, cu predominenţa fracţiunilor cu dimensiuni moleculare mai reduse, ca albuminele, glucoproteina α_1-acidă, hemopexină, transferină. Restul proteinelor din LCR sunt produse local, în epiteliul plexurilor vasculare şi în plasmocite, ca: *ß-oligoproteina* cu masa moleculară de 23 000 d, cu concentraţia de 0,033 g/l; *prealbumina* cu masa moleculară de 61 000 d, în cantitate de 0,017 g/l; γ-globuline cu masa moleculară de 81 000 d şi în cantitate de 0,006 g/l; precum şi o γ-oligoglobulină cu masa moleculară de 13 000 d, în cantitate de 0,006 g/l. În cazul creşterii permeabilităţii barierei hematoencefalice, cantitatea proteinelor de origine plasmatică creşte, iar cea din producţie endogenă scade în LCR.

Valoarea proteinorahiei poate fi apreciată semicantitativ cu ajutorul probei precipitării cu soluţie de fenol (*Pandy*), sau cantitativ cu ajutorul unei metode fotometrice.

Proteinele din LCR concentrat prin ultrafiltrare de 20 de ori sau în mod direct prin impregnare cu săruri de argint sau cu ajutorul focalizării izoelectrice pot fi fracţionate în medii gelificate (agar, agaroză, acetat de celuloză, poliacrilamidă). Proteinograma LCR, cu excepţia prezenţei prealbuminei, este asemănătoare proteinogramei serului şi în condiţii fiziologice prezintă valori procentuale relative. Pentru cunoaşterea valorii proteinorahiei, din aceste valori relative, pot fi calculate uşor valorile absolute, exprimate în g/l ale fracţiunilor respective:

	%	g/l
Prealbumina:	5-6	0,03
Albumina:	55-70	0,35
α_1-globuline	2-3	0,02
α_2-globuline	5-8	0,04
ß-globuline	6-10	0,05
γ-globuline	6-12	0,06

Cantitatea imunoglobulinelor este redusă în LCR. Cu metodele uzuale, de obicei, se poate determina cantitatea IgG, având valoarea normală între 0,015-0,04 g/l. La bolnavii cu leuconevraxită, în fracţiunea γ-globulinică din proteinograma LCR pot fi prezenţi şi gradienţi monoclonali. Unii markeri tumorali, de ex. CEA, pot fi puşi în evidenţă şi în LCR, având valoarea coeficientului plasmă/LCR sub 0,7.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12 Purtătorii de semnale de origine vegetală: lectinele

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Activitatea specifică a unor extracte vegetale asupra unor structuri animale este de mult cunoscută. Astfel, H. Stilmark a observat în 1888, că extractele boabelor plantei *Ricinus communis* aglutinează eritrocitele. S-a constatat că substanţa activă este o proteină vegetală, numită *ricină*. H. Hellin a observat un efect similar şi din partea extractului plantei *Abrus pectorius*, având substanţa proteinică activă, numită *abrina*. În anul 1908, Karl Landsteiner a constatat specificitatea extractelor vegetale, demonstrând manifestarea acţiunii precipitante a extractului de linte comestibilă (*Lens culinaris*) asupra hematiilor de cobai şi ineficacitatea lui asupra celor de pasăre. Ulterior a devenit clar că la baza specificităţii acestor proteine vegetale, manifestată în cursul fixării lor de anumite structuri celulare animale, stă capacitatea de a lega în mod specific unele resturi glucidice, situate în poziţie terminală în structuri glicoproteinice. Pe baza acestui fapt, la propunerea lui William C. Boyd, ele au fost denumite *lectine* (din verbul latin: *legere*). Structura lor este alcătuită dintr-o *porţiune fixatoare*, prin care lectina se fixează pe receptorii celulelor ţintă şi dintr-una *activatoare*, care transmite celulei mesajul purtat. De remarcat că şi din celulele animalelor pot fi extrase o serie de glicoproteine, de ex. hemaglutininele din plasmă, având proprietăţile lectinelor vegetale.

Prima lectină obţinută sub formă purificată în 1919 de James B. Sumner, a fost *concanavalina-A* (Con-A), un peptid cu masa moleculară de 110 000 d, extrasă din planta *Concavalia eusiformis*, cu proprietatea de a aglutina hematiile. În anul 1936, Stacey W. Howell a constatat că aceeaşi lectină precipită şi glicogenul dizolvat. Această aglutinare a putut fi însă suspendată prin adăugarea prealabilă a zaharozei la suspensia hematiilor sau a glicogenului. Zaharoza combinându-se cu capetele fixatoare de glucoză ale lectinei le împiedică să se combine cu componenţii glucidici respectivi. Faptul că lectinele pot fixa în mod specific unele glucide a fost dovedit, în 1952, de Winifred Watkins şi Walter Morgan.

Descoperirea lectinelor specifice determinanţilor glucidici ai grupelor sanguine a însemnat un progres real în practica hematologică. Astfel, William C. Boyd a demonstrat că lectina *boabelor lima* aglutinează în mod specific hematiile de grupa A, lectina plantei *Lotus tetragonlobus* cele de grupa 0, iar cea din *Bandeiraea simplicifolia*, hematiile din grupa B. În ultima vreme s-au găsit lectine care produc aglutinarea specifică a hematiilor din subgrupele A1 şi A2, din grupele M şi N etc. Winifred Watkins şi Walter Morgan au constatat, în 1953, că aglutinarea hematiilor de grupe A, B, respectiv 0, cu ajutorul lectinelor corespunzătoare, poate fi suspendată prin adăugarea la suspensie a N-acetil-glucozaminei, a galactozei, respectiv a fucozei. Aceasta înseamnă că specificitatea de grupă A este determinată de poziţia terminală a N-acetil-galactozaminei, cea de grupa B a galactozei, iar cea de grupa 0 a fucozei. Mai mult, tratarea hematiilor de grupa A, B şi AB cu enzimele N-acetil-galactozaminidază, respectiv galactozidaza, prin îndepărtarea glucidelor terminale corespunzătoare, duce la transformarea hematiilor de grupe A, B şi AB în hematii de grupa 0.

Structura lectinelor. Spre deosebire de imunoglobuline, care în ciuda variabilităţii lor funcţionale aproape infinite dispun de o structură de bază foarte apropiată, structura lectinelor este foarte variată, prezentând diferenţe individuale substanţiale. Astfel, lectina extrasă din germenii de grâu are masa moleculară de 36 000 d şi este formată din 2 lanţuri peptidice ale căror capete dispun de câte două poziţii fixatoare de glucide. Lectina boabelor soia, cu masa moleculară de 120 000 d, este formată din 4 lanţuri glicopeptidice, dispunând de câte un locus fixator de monozaharid.

Aplicarea în practică a lectinelor vegetale s-a lărgit în urma observaţiei lui Joseph C. Aub, în 1963, după care soluţia apoasă a lectinei extractibile din *germenii de grâu* (WGA) aglutinează celulele tumorale cultivate într-un mediu de cultură. S-a dovedit că şi alte lectine, de altă origine, au efecte similare. Acest fenomen nu este specific celulelor transformate malign, deoarece după Max Burger aceeaşi lectină aglutinează şi celule normale în curs de diviziune. Ca urmare, în cursul transformărilor maligne trebuie să se producă şi o decuplare a reglării ciclului celular, însoţită de o modificare substanţială a compoziţiei glucidice a glicoproteinelor de membrană.

În urma adăugării unei soluţii de lectină la o suspensie celulară, în prima fază se formează legături întâmplătoare şi dispersate între moleculele lectinelor şi componenţii glucidici ai membranelor celulare. Aceste complexe se adună în *grămezi* (*cluster*), apoi în plăci mai mari (*patch*) şi în sfârşit într-un loc, sub formă de *capac* (*cap*). Adunarea într-o zonă restrânsă a lectinelor fixate pe glicoproteinele de membrană declanşează transmiterea intracelulară a unor informaţii referitoare la reglarea ciclului celular. Schema fixării secvenţiale a lectinelor pe glucidele din membrana celulară este prezentată în figura 124.

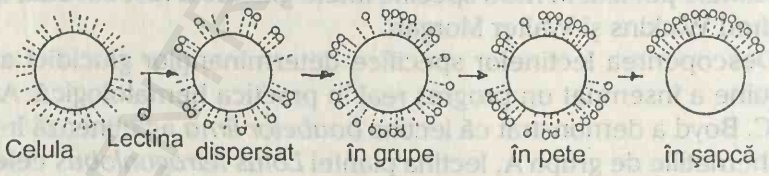


Fig. 124. Schema fixării secvenţiale a lectinelor pe glucidele din membrana celulară.

A fost o descoperire importantă (Peter C. Nowell, 1960) faptul că unele lectine vegetale, ca *fitohemaglutinina* extrasă din boabele roşii şi lectina agrişului sălbatic american (*pokeweed*), adăugate la suspensiile limfocitelor B şi T provoacă *transformarea blastică*, adică proliferarea şi diferenţierea acestora.

Lectine se produc şi în organismele animalelor. Rolul lor biologic se manifestă pe de o parte în fixarea elementelor celulare învecinate, pe de altă

parte participă la transportul şi protejarea intracelulară a glicoproteinelor proprii. Astfel, lectina fixatoare de galactoză, produsă de hepatocite, fixează acele glicoproteine care şi-au pierdut componentul lor în poziţie terminală, *acidul neuraminic*. În urma acestei scindări enzimatice, la capătul terminal al catenelor rămase apar molecule de galactoză. Complexele lectină-glicoproteină desialilate, sunt incluse prin pinocitoză în hepatocite, în care se descompun sau se cuplează din nou cu acid neuraminic şi se reîntorc în circulaţie.

Comunicările inter- şi intracelulare reprezintă factori importanţi ai adaptării la condiţiile mereu variabile ale mediului înconjurător. La vieţuitoarele superioare această acomodare se manifestă prin formarea şi funcţionarea unor serii de mediatori, cu structuri şi acţiuni biologice deosebite. Descoperirea structurilor şi funcţiilor acestor mesageri primari şi secundari ne ajută nu numai în aprofundarea cunoaşterii şi înţelegerii mai bine şi mai exacte a fenomenelor vieţii, dar şi în perfecţionarea progresivă a mijloacelor terapeutice.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13 Patochimia cancerului

13.1. Apărarea antitumorală 518
13.2. Factorul de necroză tumorală 518
13.3. Diagnosticul de laborator al tumorii maligne 519
13.4. Markerii tumorali 520

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După datele statistice ale OMS, dintre cauzele de deces ale oamenilor, după bolile cardiovasculare, cancerul este cauza imediat următoare. În momentul actual este unanim acceptată concepţia prin care la baza transformării maligne a celulelor anterior intacte stau tulburări manifestate în reglarea creşterii şi multiplicării acestor celule. Ca urmare, celulele canceroase se deosebesc de cele normale, pe de o parte din punct de vedere *morfologic* şi *funcţional*, pe de altă parte şi prin faptul că în urma desprinderii lor din masa tumorală primitivă se deplasează de-a lungul circulaţiei sanguine sau limfatice şi formează *metastaze* în alte organe sau ţesuturi.

Dintr-o altă statistică a OMS reiese la fel de clar că 85-90% din factorii cancerigeni provin din mediul înconjurător. Ca urmare, contribuţia factorilor endogeni (ereditari, boli predispozante, tulburări endocrine, imunosupresiune) la producerea transformării canceroase este de numai 10-15%. Acţiunile cancerigene pot fi amplificate şi de *unele efecte cocancerigene*, care în sine nu prezintă efecte malignizante, însă în prezenţa unei acţiuni cancerigene duc la creşterea acesteia.

În condiţii normale, creşterea numerică prin multiplicarea celulelor intacte stă sub un control riguros. Acest control deosebit de sensibil cuprinde atât păstrarea masei normale a ţesuturilor şi organelor, cât şi regenerarea ţesuturilor lezate. Făcând abstracţie de multiplele forme ale *diviziunilor celulare atipice, diviziunea celulară tipică* poate să se desfăşoare sub următoarele 3 forme: diviziunea celulară *directă* (la procariote), *indirectă* (la eucariote) şi *reducătoare* (*meioza*, la celulele germinative). Celulele în repaus (*interfaza*) se află în faza G_0. Fiind stimulate de factori de creştere specifici (epitelial, EGF; neuronal, NGF; factorul stimulator al coloniilor celulare, CSF; factorul de creştere derivat din plachete, PDGF etc.) celulele trec în prima fază a creşterii (G_1) din cadrul ciclului celular. În această fază se manifestă o activitate anabolică susţinută, urmată de sinteza abundentă a ADN (S). Aceste faze au loc în interfază, după care urmează o nouă fază de creştere (G_2), cu acumularea materialelor structurale şi funcţionale (enzime) necesare celulelor fiice. În ultima fază (M) a ciclului celular are loc mitoza. La eucariote ciclul celular durează circa 24 de ore. Durata în timp a ciclului este identică şi în cazul celulelor tumorale. Creşterea excesivă a acestora nu se datorează deci prescurtării ciclului, ci repetării lui practic fără întrerupere, cu lipsa perioadelor G_0 lungi.

Proliferarea numerică a celulelor ţesuturilor în regenerare se opreşte în momentul în care masa ţesutului format devine egală cu masa lui iniţială. Această inhibiţie a creşterii se manifestă şi în culturi de celule (fibroblaşti): celulele crescute pe suprafaţa mediului nu se mai multiplică în urma extinderii lor pe întreaga suprafaţă disponibilă. În acest moment toate celulele intră în contact fie între ele, fie cu pereţii recipientului. Din acest motiv această formă mecanică a inhibării creşterii celulare a fost numită *inhibiţie prin contact*. Această inhibiţie prin contact nu se manifestă în cazul celulelor canceroase cultivate care cresc nelimitat în cultură. În urma adăugării inhibitorilor plasminei (EACA, PAMBA, AMCHA) la mediul de cultură, inhibiţia prin con-

tact se manifestă şi în cazul celulelor canceroase cultivate. Aceasta însă nu influenţează deloc caracterul lor neoplazic.

Factorii de creştere formaţi sub controlul protooncogenelor sub forma unor peptide purtătoare de semnale acţionează la nivelul receptorilor specifici de membrană a celulelor ţintă, care transmit semnalul recepţionat în interiorul lor prin anumiţi mesageri secundari. În genomul uman, până în prezent, au fost identificate circa 50 de protooncogene, respectiv un număr de peste 100 de gene implicate în transformări maligne, în comparaţie cu un număr de sub 10 gene supresoare de tumoră. Produşii protidici ai acestor gene suprimă manifestarea efectelor malignizante ale oncogenelor. Mutantele lor inactive însă favorizează transformările tumorale. Reprezentanta lor cea mai importantă este *gena supresoare tumorală p53*, localizată în braţul lung al cromozomului 13. Produsul ei este o fosfoproteină cu masa moleculară de 53 d (p53), fixată de antigenul macromolecular al virusului simian SV40 T. Prin această fixare, p53 inhibă manifestarea efectelor cancerigene ale acestuia. Absenţa, inactivarea sau lezarea ei duce la manifestarea unor tumori maligne, cum este carcinomul hepatocelular, carcinomul scuamos al tegumentelor.

Repetarea ciclurilor celulare, cu lipsa perioadelor de interfază (G_0) la celulele transformate malign, pledează pentru scăparea lor de sub control. O altă caracteristică a celulelor neoplazice o constituie *schimbarea fundamentală a structurii şi funcţiilor lor*. În sfârşit, după o anumită perioadă de creştere tumorile dau şi *metastaze*.

Transformarea malignă a celulelor este un proces complex, care se manifestă după un program bine delimitat în spaţiu şi timp. Acest fapt reiese şi din observaţia după care malignizarea nu porneşte imediat din momentul manifestării efectului cancerigen. Prima fază a cancerogenezei o constituie "*promoţia*". O acţiune de "*promotor*" poate fi manifestată atât prin factorul cancerigen însuşi, cât şi de unul *cocarcinogen*. Timpul ce trece între iniţierea şi apariţia tumorii maligne se poate modifica între limite destul de largi. De ex. în cazul hidrocarburilor policiclice din gudroanele rămase în urma distilării fracţionate a ţiţeiului, această perioadă poate fi chiar şi de 20-30 de ani.

Faza propriu-zisă a cancerogenezei o constituie *iniţierea* transformărilor celulare prin *diferenţiere*. Această fază este de obicei rapidă, şi odată declanşată nu mai poate fi oprită. Modificările (mutaţiile) genetice realizate se înscriu în genomul celulelor şi se transmit la descendenţi. Uneori, celulele transformate se pot păstra în ţesuturi sub formă latentă, fiind activate ulterior, fie prin "promotori" endogeni, fie prin factori exogeni, ca radiaţii ionizante, unele lectine (PHA, Con-A) etc.

Factorii oncogeni de origine exogenă pot fi: 1) fizici: mecanici (lovitură, frecţie), calorici (căldura, frigul, arsura, congelarea), radiaţii ionizante (UV, raze X, raze radioactive, explozie nucleară, radiaţii cosmice); 2) chimici: gudroanele din ţiţei şi fumul de ţigări, insecticide, ierbicide, materii plastice, dezinfectanţi, lectine, unele medicamente, substanţe de uz casnic etc.; 3) biologici: virusuri oncogene, conţinând ARN sau ADN.

Dintre factorii cancerigeni cuprinşi în cele 3 grupe mai sus enumerate, fără îndoială, substanţele chimice sunt cele mai însemnate. Aceasta se explică pe de o parte prin faptul că paralel cu dezvoltarea continuă a industriei chimice numărul lor creşte continuu, iar pe de altă parte, prin intermediul aerului intoxicat sau al apei şi alimentelor contaminate, substanţele chimice cancerigene pot pătrunde uşor şi continuu în organism. În sfârşit, substanţele chimice cancerigene înseamnă un pericol deosebit, din cauza faptului că o dată pătrunse în organism, majoritatea lor se descompun şi se elimină lent sau deloc din organism.

Prima boală canceroasă, manifestată sub forma unei boli profesionale (carcinomul scrotului la hornari), a fost descrisă de medicul londonez Percival Pott, în anul 1775. Primele substanţe organice cancerigene (benzpirenul şi dimetilbenzantrancenul) au fost extrase din gudroanele ţiţeiului şi identificate de Katsusaburo Yamagiwa şi Kamuro Ishikwa, în anul 1916. Ulterior s-a constatat că *2-naftilamina*, prezentă ca impuritate în coloranţii folosiţi în industria textilă, precum şi *clorura de vinil, dimetilnitrozamina*, dar şi unele elemente anorganice (ca arsenul, zincul, cromul, nichelul etc.) acţionează drept carcinogene.

Şi alimentaţia zilnică cuprinde o serie întreagă de substanţe cancerigene. Bruce N. Ames, şeful Institutului de Biochimie al Universităţii din Berkeley (SUA), a demonstrat că, alături de băuturile alcoolice şi substanţele conservante uzuale (azotiţi, azotaţi), în elementele crude sau preparatele culinare există minimum 16 substanţe diferite care, administrate la animalele de experienţă, acţionează cancerigen.

Creşterea tumorală este condiţionată atât de proprietăţile biologice ale tumorii însăşi, cât şi de reactivitatea organismului gazdă. Caracteristica fundamentală a transformării maligne a celulelor o constituie simplificarea structurilor şi funcţiilor celulare, numită *dediferenţiere* sau *anaplazie*. Pe plan histopatologic, tumorile maligne se deosebesc prin gradul lor de dediferenţiere. Astfel, celulele unui ţesut tumoral cu *anaplazia de gradul I* prezintă numai deosebiri minore faţă de ţesutul normal. În general, tumorile de acest tip prezintă o rată de proliferare mai redusă, fac mai rar metastaze. Tumorile de gradul III sau IV al metaplaziei cresc mai rapid, produc mai frecvent metastaze. În urma extirpării chirurgicale a tumorii de acest tip, pericolul manifestării unei recidive este mai mare.

Complicaţia cea mai periculoasă a cancerului o constituie manifestarea *metastazelor*. Michel Feldman şi colaboratorii săi au examinat activitatea enzimei *colagenaza*, care în cursul metastazării tumorilor maligne experimentale poate descompune substanţa fundamentală şi membrana bazală din jurul vaselor mici, favorizând astfel desprinderea şi pătrunderea în circulaţie a unor celule malignizate. S-a constatat, însă, că nici colagenaza, nici activatorul tisular al plasminogenului (TPA) nu influenţează frecvenţa metastazelor. În schimb, s-a descoperit că procesul de metastazare este iniţiat de aderarea celulelor tumorale pe membrana bazală a vaselor mici apropiate. Aderarea celulelor se manifestă prin nişte structuri receptoare adecvate, si-

tuate pe suprafaţa lor externă. În cursul fazei următoare se activează unele *metaloproteaze*, care descompun membrana bazală la locurile de fixare ale celulelor tumorale. În faza a treia, celula tumorală traversează membrana lezată prin mişcări ameboide (pseudopode) şi pătrunde în circulaţie. Până în momentul de faţă au fost identificaţi 8 membri diferiţi ai familiei metaloproteazelor, având structuri similare, dar cu specificitatea de substrat deosebită. Colagenul de tip IV, prezent în membranele bazale ale vaselor, reprezintă substratul specific al metaloproteazei tumorale. Enzima se găseşte sub formă inactivă, miezul ei fiind blocat de un oligopeptid, conţinând cisteina. În urma îndepărtării proteolitice a acesteia enzima devine activă. Aceasta poate fi însă blocată de inhibitori tisulari, tot de natură proteinică (*Tissue Inhibitors of Metall-Proteinases: TIMP*), care suprimă formarea metastazelor. O genă din genomul celulelor tumorale nemetastazante controlează biosinteza unei proteine, numită *nm23* (*nonmetastatic 23*), care blochează atât activarea metaloenzimei inactive, cât şi funcţionarea celei active. Lipsa sau lezarea genei reglatoare biosintezei proteinei nm23 duce la creşterea substanţială a capacităţii metastatice a tumorilor maligne. Recent s-a descoperit şi acţiunea inhibitoare similară a unor compuşi sintetici, ca *aminoimidazolii carboxiamidici* (CAI), care acţionează prin modificarea fluxului ionilor de Ca^{++} peste canalele lente ale membranelor celulelor.

13.1. Apărarea antitumorală

În comparaţie cu probabilitatea manifestării neoplaziilor, în realitate, frecvenţa apariţiei acestora este mult mai redusă. Această deosebire poate fi explicată prin existenţa şi funcţionarea în organism a unor mecanisme, care pe de o parte neutralizează acţiunile factorilor cancerigeni, iar pe de altă parte distrug celulele transformate malign. Printr-o funcţie continuă de *supraveghere imună*, limfocitele T0 (ucigaşe naturale, *Natural Killer*, NK) descoperă şi distrug celulele transformate malign, a căror supravieţuire şi proliferare numerică devine posibilă numai în cazul unei imunosupresiuni înnăscute sau dobândite.

13.2. Factorul de necroză tumorală

La sfârşitul secolului trecut, un chirurg din New York, William B. Coley a observat că injectarea intratumorală la animale de experienţă, a unor suspensii microbiene Gram negativi vii sau inactivate duce la necrotizarea

hemoragică a tumorilor. Ulterior, s-a constatat că aceşti microbi conţin nişte lipopolizaharide, numite *endotoxine* care prin activarea nespecifică a sistemului properdinic duc la manifestarea unor inflamaţii vasculare hemoragice. Efecte similare au fost observate şi în urma vaccinării animalelor cu BCG. Patologul Lloyd L. Old a observat că serul animalelor tratate cu endotoxine sau vaccinate cu BCG, injectat la animale purtătoare de tumori experimentale, provoacă *necrotizarea* hemoragică a ţesuturilor neoplazice. Factorul activ proteinic a fost numit *factor de necroză tumorală* (TNF) sau *cahectină*.

TNF nu prezintă specificitate de specie. Factorii izolaţi din diferite specii de animale sunt activi şi în alte specii, deşi prezintă diferenţe structurale însemnate. Astfel, TNF izolat din rozătoare conţine 157 de aminoacizi, cel de origine umană are o catenă peptidică mai lungă cu 76 de aminoacizi. TNF nu acţionează în mod selectiv asupra tumorilor maligne, ci similar cu bradikinina, producând o inflamaţie microvasculară hemoragică mult mai puternică. În cantităţi reduse, prin declanşarea unei inflamaţii mai limitate, TNF are efecte pozitive asupra apărării. Produs însă în exces dăunează vaselor şi poate declanşa chiar şi un şoc hemoragic mortal. Ca urmare, şi TNF a fost cuprins în grupa substanţelor modificatoare a răspunsului biologic (*Biological Response Modifiers*, BRM), ca interleukinele.

13.3. Diagnosticul de laborator al tumorii maligne

Pornind de la modificările structurale manifestate în urma transformărilor tumorale ale celulelor, metodele diagnostice de laborator ale neoplaziilor s-au axat la început pe identificarea unor metaboliţi sau enzime de origine tumorală, presupuse deosebite de cele normale. Ulterior a devenit clar că, practic, nu există deosebiri substanţiale între metabolismul celulelor normale şi neoplazice. Astfel, ca expresie pe plan nespecific a inflamaţiei peritumorale, creşte viteza de sedimentare a hematiilor, creşte cantitatea în plasmă a reactanţilor de fază acută şi apare şi proteina C-reactivă împreună cu proteinograma de tipul inflamaţiei subacute-cronice.

În urma modificării structurii membranei celulelor transformate malign creşte cantitatea *enzimelor transferaze*, care prelungesc catenele laterale ale glicoproteinelor fixate prin transferarea resturilor glucidice, ca glucozaminil-, galactozil-, fucozil-, sialil-, neuramidil-transferaze. Determinarea activităţii acestor enzime este însă laborioasă. Astfel, în practica clinică se foloseşte determinarea *izoenzimelor*, ca de ex. o variantă de migrare electroforetică lentă a *lactatdehidrogenazei* (LDH) sau o izoenzimă a fosfatazei acide prostatice.

13.4. MARKERII TUMORALI

O valoare diagnostică mult mai mare le revine *markerilor tumorali*, structuri glicoproteinice cu caracter antigenic, produse de celulele transformate malign. O parte din aceste substanţe nu sunt produşi propriu-zişi canceroşi, ci *antigene asociate tumorilor* (*Tumor Associated Antigens*, TAA). Astfel, α_1-fetoproteina (AFP) se formează în hepatocite, antigenul carcino-embrionar (CEA) în celulele epiteliale din tubul digestiv, dar numai în cursul vieţii embrionare. După naştere nu se mai produc din cauza suprimării funcţionării genelor respective. În urma transformării tumorale a hepatocitelor sau a celulelor epiteliale digestive, genele suprimate se reactivează şi îşi reîncep transmiterea informaţiilor referitoare la biosinteza TAA.

Alţi markeri tumorali sunt pe de o parte componenţi ai membranei celulelor tumorale, pe de altă parte se formează de către celulele sănătoase, ca o reacţie la transformarea malignă a acelora din apropiere. Markerii tumorali sunt determinaţi de fenotipul celulei canceroase şi nu prezintă nici o imunogenitate în organismul gazdă. Punerea în evidenţă sau dozarea lor cantitativă în plasmă se face fie prin metode radioimune (RIA), fie cu ajutorul metodelor imunoenzimatice (ELISA).

Markerii tumorali sunt cuprinşi în următoarele grupe:

a) *Antigene oncofetale* şi *oncoplacentare*, ca AFP, CEA, coriongonadotropina umană (hGC), glicoproteina ß1 specifică graviditătii (SP_1), fosfataza alcalină placentară (PAP).

b) *Antigene definite de hibridoame*: CA 19-9 şi CA 50 (haptena glucidică din grupa sanguină Lewis), CA 125 şi CA 15-3 (în tumori genitale şi mamare feminine, respectiv pancreatice).

c) *Antigenele de proliferare şi de diferenţiere celulară*: enolaza neuronspecifică (NSE), fosfataza acidă prostatică (PAP), antigenul specific prostatic (PSA), antigenul polipeptidic tisular (TPA), ß2 microglobulina (lanţurile uşoare ale markerilor HLA de clasa I).

d) *Hormoni produşi ectopic*: ACTH, tireocalcitonina, coriongonadotropina umană, insulina, parathormonul, somatomedina, peptidul intestinal vasoactiv (VIP).

e) *Proteine produse ectopic*: lanţurile uşoare (proteina Bence-Jones) şi lanţurile grele ale Ig, Ig monoclonale, feritina.

Identificarea şi determinarea cantitativă a markerilor tumorali nu are o valoare diagnostică absolută. În general, cantitatea lor prezentă în plasmă nu poate fi corelată cu extinderea tumorii, cu gravitatea necrozelor sau a metastazelor. Deşi creşterea cantităţii în plasmă a unui marker tumoral deasupra limitei fiziologice indică probabilitatea prezenţei tumorii respective, diagnosticul trebuie totdeauna confirmat şi cu ajutorul altor metode uzuale clinice şi radiologice. Ca urmare, explorarea de laborator a markerilor nu poate fi utilizată pentru triajul suspecţilor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson D.J., *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Edition, Garland Publ. Inc. New York, London, 1994.

2. Bâră C., *Imunologie fundamentală*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1996.

3. Cernescu C., *Virusologie medicală*. Ed. Medicală, Bucureşti, 1996.

4. Cotran R. S., Kumar V, Robbins S.L. *Pathologic Basis of Disease*, 5th Edition, W. B. Saunders Comp. Philadelphia. 1994.

5. Cucuianu M., Crâsnic I., Pleşca-Manea Luminiţa, *Biochimie Clinică*, Ed. Dacia Cluj-Napoca, 1998.

6. Dinu Veronica, Truţia E., Popa Cristea Elena, Popescu Aurora, *Biochimie medicală mic tratat*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1996.

7. Davidson V., Sittman D., *Biochemistry*, 3rd Edition, Harwal Publishing Philadelphia, Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, 1994.

8. Karlson P., Gerok W., Gross W., *Patobiochemie-Eine Einführung für Studierende und Ärzte*, 3, überarbeitete und erweiterte Auflage, G. Thieme, Stuttgart, 1994.

9. Karlson P., Doenecke D., Koolman J., *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftlen*, 14, neubearbeitete Auflage, G. Thieme, Stuttgart, 1994.

10. Kessler S., *Memorix Spezial Labordiagnostik. Medizin VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim, 1992.

11. Laker M.F., *Clinical Biochemistry for Medical Students*, W.B. Saunders Co Ltd. London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo, 1996.

12. Mihele Denisa, Maria Pavlovici, *Biochimie clinică – Metode de laborator*, Ed. Medicală, Bucureşti, 1996.

13. Ravel R., *Clinical Laboratory Medicine – Clinical Application of Laboratory*, Data. 6th Edition Mosby Year-Book Inc., St. Louis, 1995.

14. Rick W., *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 6, über arbeitete und erweiterte Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 1990.

15. Streyer L., *Biochemistry*, 4th Edition, W.H. Freeman & Co. New York, 1994.

16. Thomas L., *Labor und Diagnose. Indikationen und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, 4, überarbeitete und erweiterte Auflage, Die medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992.

17. Voet D., Voet Judit G., *Biochemistry*, John Wiley & Sons. Inc. Baltimore, 1990.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Breviar de laborator clinic

Valorile normale şi patologice ale analizelor de laborator clinic 525
I. Examinări de hematologie
Explorarea sistemelor celulare ale sângelui 527
A. Tehnici de recoltare a sângelui 527
B. Explorarea sistemului eritrocitar 528
C. Explorarea seriei leucocitare 534
D. Explorarea seriei plachetare 537
II. Explorarea de laborator a hemostazei 538
A. Explorarea de laborator a fazei vasculoplachetare 538
B. Explorarea de laborator a fazei plasmatice (a coagulării propriu-zise) 539
III. Explorarea parametrilor biochimici din ser 547
Echilibrul acido-bazic 551
Enzimele 552
Ionograma 554
Cationi 554
Anioni 555
Lipide, Lipoproteine 556
Oligoelemente 558
Markeri tumorali 558
Proteine plasmatice 560
IV. Explorarea de laborator a urinei 563
A. Examenul fizic şi chimic calitativ al urinei 563
B. Examinări chimice cantitative din urina de 24 de ore 565
C. Ionograma urinară 567
V. Explorarea de laborator a tubului digestiv 569
VI. Examinarea de laborator a lichidului cefalorahidian (LCR) 571
VII. Explorarea de laborator a transsudatelor şi exsudatelor 573
VIII. Examinarea de laborator a sudoarei 574

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

CHIMIE CLINICĂ
TOP DIAGNOSTICS
Bd. Mărăşti nr. 35, Sector 1,
Bucureşti, ROMANIA
Tel./Fax: (401) 224 11 83; 224 35 61
224 35 63; 224 35 66
E-mail: topdiag@Fx.ro
HEMATOLOGIE
distribuitor exclusiv
Roche Diagnostics
IMUNOLOGIE
COAGULARE
SISTEME AUTOMATE PCR
TESTE ŞI APARATURĂ

Valorile normale și patologice ale analizelor de laborator clinic

Sistemul Internaţional (SI) al unităţilor de măsură

Exprimarea mărimilor (activităţilor) de orice fel (iar în cazul examinărilor de laborator clinic, de ex. a valorilor obţinute cu diverse probe) s-a făcut până nu de mult prin diferite unităţi de măsură, neunitare, uneori empirice. Astfel, se exprimă concentraţia unor substanţe în grame sau miligrame la decilitru sau la litru, respectiv kilogram etc. Din cauza necesităţii utilizării universale a principiilor ştiinţifice exacte, precum şi a schimburilor naţionale şi internaţionale de informaţii profesionale, s-a preconizat uniformizarea internaţională a sistemului de unităţi de măsură, sub forma aşa-numitului **Sistem Internaţional** (SI). În domeniul medical acest sistem a fost adoptat (ca o recomandare generală) de către cea de-a 30-a Adunare Generală a OMS din 1977. În ţara noastră a fost adoptat în 1980.

Scopul introducerii SI este acela de a înlocui vechile sisteme de exprimare a mărimilor, a activităţilor, adeseori mai puţin ştiinţifice şi mai ales diferite de la o ţară la alta, dar şi de la o instituţie la alta în aceeaşi ţară, ceea ce face greu de comparat între ele date de provenienţă diferită, cu un sistem riguros ştiinţific, exact, unitar, reproductibil şi comparabil pe plan general.

Redăm foarte succint principalele unităţi de măsură SI, a căror utilizare trebuie să se generalizeze şi în domeniul medical în ţara noastră.

Unităţi de bază:	**Denumire:**	**Simbol:**
Masă (greutate)	gram, kilogram	g, kg
Lungime	metru	m
Timp	secundă	s
Căldură	joule	j
Unităţi derivate:	**Denumire:**	**Simbol:**
Suprafaţă	metru pătrat	m^2
Volum	metru cub	m^3
Viteză	metru pe secundă	m/s
Presiune	pascal (Newton/m^2)	N/m^2
Cataliză (enzimatică)	katal-cantitate de enzimă care transformă 1 mol substrat/sec.	kat. mol/sec

Alte unităţi de măsură SI utilizate în laboratorul clinic:

Unităţi de bază:	**Denumire:**	**Simbol:**
Concentraţia masei (masa de substanţă dizolvată în volumul solventului)	grame pe litru	g/l
Concentraţia masei de materie (nr. moli raportat la volum)	moli pe litru	mol/l
Concentraţie de număr (nr. de particule sau entităţi elementare dintr-un amestec raportat la întregul volum)	număr pe litru	nr./l
Fracţia de număr (proporţia particulelor de un tip dintr-un amestec, raportată la întregul volum al amestecului considerat ca unitate; suma fracţiilor fiind egală cu 1)	Ex.: Nr. leucocite/litru Ex.: Val. procentuală a elementelor albe:	Neutr.: 0,55; Li.: 0,35; Mo.: 0,05; Eo.: 0,04; Ba.: 0,01; Total: 1,0
Fracţia de volum (volumul unui constituent al unui amestec raportat la întregul volum al amestecului: vol./vol.	Ex.: Hematocritul, adică fracţia de volum a elementelor figurate (volumul eritrocitar din amestecul sângelui = 0,45)	

Prefixe şi notări pentru multiplii sau diviziuni ale unităţilor SI de bază

Multipli:	**Diviziuni:**
kilo = K x 10^3 = x 1 mie	mili = m x 10^{-3} = x 0,001
mega = M x 10^6 = x 1 milion	micro = μ x 10^{-6} = x 0,000001
giga = G x 10^9 = x 1 miliard	nano = n x 10^{-9} = x 0,000000001
	pico = p x 10^{-12} = x 0,000000000001
	femto = f x 10^{-15} = = x 0,000000000000001
	eto = e x 10^{-18} = = 0,000000000000000001

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prescurtări de uz internaţional pentru materialul biologic examinat:

B (Blood) = sânge	d (diary) = cantitatea raportată la 24 de ore
P (Plasma) = plasmă	dU (diary urine) = urina din 24 de ore
S (Serum) = ser	Sf (Spinal fluid) = lichid cefalorahidian
U (Urine) = urină	F (Feces) = materii fecale, scaun

I. Examinări de hematologie. Explorarea sistemelor celulare ale sângelui

A. Tehnici de recoltare a sângelui

1. Tehnica recoltării sângelui capilar

Se recoltează cu pipete adecvate, din pulpa degetului sau lobului urechii. Recoltarea se face de regulă dimineaţa, pe nemâncate (în cazuri de urgenţă recoltările pentru leucocite sau pentru hematocrit se fac la orice oră). Se dezinfectează pulpa degetului (de preferat degetul IV) sau lobul urechii, prin badijonare cu un tampon de alcool sau alt dezinfectant uzual. Se şterge cu un tampon uscat (locul de înţepat să fie uscat). Se înţeapă cu un ac steril (pentru o singură folosinţă) în unghi de 45° faţă de linia mediană a pulpei degetului sau cu o lanţetă specială pentru o singură folosinţă la lobul urechii. Prima picătură de sânge se şterge cu un tampon uscat. Se recoltează picătura (picăturile) următoare, care apare spontan sau prin uşoară apăsare (strângere) a degetului până la o distanţă de cel mult 2 cm de locul înţepăturii (până la falanga a 2-a). Este interzisă strângerea energică şi/sau până la locul înţepăturii, spre a nu dilua sângele cu suc interstiţial. Recoltarea se face în pipete adecvate fiecărei tehnici de examinare în parte, fără sau cu diluţie în diferite soluţii. Pipetele şi soluţiile trebuiesc pregătite înainte de înţepare.

2. Tehnica recoltării sângelui venos

Se recoltează din venele plicii cotului (sau din vena jugulară sau venele epicraniene la copii mici sau din alte vene superficiale de la bolnavi, la care este imposibil de găsit o venă accesibilă la plica cotului). Se aplică garoul la cel puţin 2-3 laturi de deget (3-5 cm) deasupra locului de înţepare. Bolnavul va strânge pumnul pentru a crea o presiune venoasă crescută şi o distensie maximă a venelor acelui segment de membru. Se dezinfectează cu un tampon cu alcool sau cu tinctura de iod diluată. Se pătrunde cu un ac solitar steril (sau cuplat cu un container etanş) cu calibru adecvat cantităţii de sânge necesară să fie recoltată. Sângele se recoltează ca atare sau pe cantităţi bine

definite de substanţe sau soluţii anticoagulante sau inhibitoare (oxalaţi, heparină, EDTA, fluorură).

3. Tehnica executării frotiurilor de sânge pe lamă

Se pregăteşte întocmai ca şi la tehnica recoltării sângelui capilar. Se recoltează din picătura ulterioară (mai groasă) cu marginea (latura mică a dreptunghiului) unei lame de sticlă, de preferat şlefuită (lamă de recoltare). Această margine de lamă, cu picătura de sânge, se aşează oblic (în unghi aprox. de 45°) pe cealaltă lamă de sticlă (lama de frotiu), degresată în prealabil cu alcool-eter şi uscată bine prin ştergere cu un tampon uscat şi fluturare în aer. Se ţine lama de recoltare câteva secunde până picătura de sânge se etalează complet spre cele două margini ale lamei de bază. Se deplasează apoi lama de recoltare prin întindere spre capătul opus al lamei de frotiu, până picătura de sânge se epuizează. Un frotiu corect trebuie să se termine înainte de capătul opus al lamei şi să fie uniform şi cât mai subţire. Frotiurile se usucă la temperatura camerei pe un rastel de lame. Se fixează şi se colorează ulterior după diferite tehnici. Lamele de frotiu se păstrează ferite de căldură, umezeală, chimicale şi insecte.

B. Explorarea sistemului eritrocitar

1. Numărul hematiilor

Se efectuează din sânge capilar (sau venos, recoltat pe EDTA), cu ajutorul unor pipete diluante, fie în camere speciale de numărat (Bürker, Bürker-Türk, Thoma, Neubauer) la microscop, fie în aparate speciale, numărătoare de particule.

Valori normale:milioane pe mm^3

Bărbaţi:4,5-5,5
Femei:4,0-5,0
Copii:3,8-5,2
Nou-născuţi:5,0-6,0

Valori patologice:

Creştere: Poliglobulie sau hemoconcentraţie
Scădere: Anemie (foarte rar şi pasager în hemodiluţie)

2. Dozarea hemoglobinei

a) Metoda colorimetrică comparativă (Sahli)

Principiu: Intensitatea culorii clorhidratului de hematină produs prin tratarea sângelui cu acid clorhidric diluat se compară cu culoarea unui tub etalon. Valorile se exprimă procentual în raport cu valoarea normală şi sunt numai aproximative şi orientative.

Valori normale: 80-100%

b) Metoda fotometrică

Principiu: Hemoglobina se oxidează cu fericianură de potasiu în

methemoglobină (hemiglobină), care în prezenţa cianurii de potasiu dă un compus cianuric foarte stabil, cu absorbţia maximă la 540 nm.

Valori normale:	mmol/l	g/l
Bărbaţi:	2,2-2,7	140-180
Femei:	1,7-2,7	130-180
Copii:	1,7-1,25	115-148

3. Hematocritul: Fracţia volumului eritrocitar

Reprezintă fracţia din volumul sanguin ocupată de totalitatea elementelor figurate (practic a eritrocitelor) din acel volum de sânge (volumul eritrocitar raportat la volumul sanguin total). Se obţine prin centrifugarea sângelui recoltat pe anticoagulant într-o eprubetă gradată şi îngustă (sau capilară în cazul micrometodei). Elementele figurate (şi mai ales masa eritrocitelor) se separă de plasmă şi se poate evalua raportul cantitativ între volumul reprezentat de eritrocite şi volumul total al sângelui.

Valori normale:

Bărbaţi:45% (39-51)
Femei:41% (35-49)
Copii:41% (38-44)

Modificări patologice:

Creştere: Policitemie, hemoconcentraţie (plasmoragie)
Scădere: Anemie, hemodiluţie (hipervolemie, hidremie)

4. Volumul sanguin: Volemia

Principiu: se obţine prin injectarea iv. a soluţiei sterile a unui colorant nedifuzibil (albastru Evans 0,5%) într-o cantitate bine cunoscută. Se recoltează sânge înainte şi la 3 minute de la injecţie şi se determină concentraţia colorantului. Din cele două valori ale concentraţiei şi ţinând seama de valoarea hematocritului se calculează volumul plasmatic.

Valoarea normală: 76,6 ml/kg corp

Variaţii simultane cu hematocritul:

Hipervolemie cu Htc. crescut; poliglobulii
Hipovolemie cu Htc. scăzut: anemii cronice

Variaţii disociate faţă de hematocrit:

Hipervolemie cu Htc. normal sau scăzut: retenţie de apă (la cardiaci decompensaţi, la renali)
Hipovolemie cu Htc. normal: hemoragii, denutriţie cronică
Hipovolemie cu Htc. crescut: scăderea reală a volumului plasmatic (plasmoragii acute, stări de şoc, arsuri, pierderi cronice de Na)

5. Diametrul eritrocitar

Principiu: Montând la microscop un ocular cu micrometru, se măsoară diametrul a 100 eritrocite pe frotiul colorat după May-Grünwald-Giemsa, alegând o porţiune de frotiu cât mai corect întinsă şi colorată. Se calculează media celor 100 de valori citite. Acesta este diametrul mediu eritrocitar. În

cazul în care se numerotează separat valorile diametrului din 0,5 în 0,5 μ se poate face un grafic al distribuţiei hematiilor în funcţie de mărimea diametrului: aceasta este curba lui *Price-Jones*.

Valori normale:

Diametrul eritrocitar mediu: 7,2 μ

Curba Price-Jones se întinde între 6 şi 9 μ, cu vârful 7,7μ.

Modificări patologice:

Diametrul mediu mai mic şi curba P-J deviată spre stânga (predomină valorile mici, apărând şi valori sub 6 μ): microcitoză (în anemii hipocrome, feriprive); microsferocitoză (în anemii hemolitice congenitale, corpusculare).

Diametrul mediu mai mare şi curba P-J deviată spre dreapta (predomină valorile mai mari, apărând şi valori peste 9 μ, chiar până la 12-14 μ): macrocitoză sau megalocitoză (anemii macrocitare şi megaloblastice).

Curba P-J cu două vârfuri: unul normal, celălalt este situat la stânga, apare după transfuzii masive în anemii microcitare.

6. Indici eritrocitari

a) Valoarea globulară sau indicele de culoare: Vg

Se calculează din raportul valorii procentuale a hemoglobinei (Hb) şi primele două cifre ale numărului de hematii (N) înmulţite cu 2:

$$Vg = \frac{Hb\%}{N \times 2}$$

Valoarea normală: 1,0 (0,85-1,15)

Valori < 0,8 = hipocromie (anemii feriprive)

Valori > 1,15 = hipercromie (anemii macro- şi megaloblastice)

b) Volumul eritrocitar mediu: Ve

Se calculează din raportul valorii procentuale a hematocritului înmulţit cu 10 şi al numărului eritrocitelor în milioane (N). Se exprimă în μ:

$$Ve = \frac{Hct. \times 100}{N}$$

Valoarea normală: 87μ (82-92)

Valori > 86 μ = macrocitoză

Valori < 80 μ = microcitoză

c) Grosimea medie a eritrocitelor: G

Considerând eritrocitul ca un disc plat, se calculează grosimea după formula:

$$G = \frac{4\,V}{D^2}$$

în care, V = volumul eritrocitar mediu; D = diametrul eritrocitar mediu
Valoarea normală: 2,1 μ (1,7-2,5 μ)
Valori > 2,5 μ = sferocitoză
Valori < 1,7 μ = plasticitoză (lepticitoză)

d) Indicele de sfericitate: IS

Este raportul dintre diametrul mediu (D) şi grosimea medie (G):

$$IS = \frac{D}{G}$$

Valoarea normală: 3,4 (3,1-3,7)
Valori < 3,1 = sferocitoză
Valori > 3,7 = plastocitoză (leptocitoză)

e) Suprafaţa eritrocitară medie: S

Se calculează după formula:

$$S = \frac{D^2 \cdot 4\,V}{2 \cdot D}$$

în care, D = diametrul eritrocitar mediu; V = volumul eritrocitar mediu
Valori normale: 129 μ^2 (120-135)

f) Conţinutul eritrocitar mediu în hemoglobină: HbEm

Se calculează în picograme (pg), după formula:

$$HbEm = \frac{Hb}{E}$$

în care, Hb = cantitatea Hb în grame la 1 000 ml sânge; E = numărul de eritrocite pe mm^3 (în milioane)
Valori normale:28,5 pg (26-31)
Valori crescute:macrocitoză, megalocitoză
Valori scăzute:microcitoză

g) Concentraţia eritrocitară medie în hemoglobină: HbE%

Concentraţia în Hb a eritrocitului exprimată în procente relative: volumul procentual ocupat de Hb din volumul total al eritrocitului. Se calculează după formula:

$$HbE = \frac{Hb \times 100}{Htc}$$

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în care, Hb = grame de Hb la 100 ml sânge
Valori normale: 33% (32-33)
Valori crescute: nu există
Valori scăzute: microcitoză, hipocromie

7. Rezistenţa globulară

a) Rezistenţa osmotică

Este rezistenţa eritrocitelor la soluţii hipoosmotice.

Principiu: se urmăreşte comportarea eritrocitelor în soluţii de NaCl de diferite concentraţii hipoosmotice, cu indicarea concentraţiilor la care începe hemoliza şi la care hemoliza este totală.

Valori normale: Hemoliză iniţială la 0,46-0,42% NaCl şi hemoliză totală la 0,38-0,34% NaCl.

În cazurile în care hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mari de NaCl, rezistenţa osmotică este scăzută (icter hemolitic congenital, intoxicaţii cu benzen, uneori în hepatita A), iar când hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mici, rezistenţa este crescută (talasemia, după hemoragii acute, după splenectomie, uneori în anemia Biermer, icter mecanic, anemii feriprive).

b) Rezistenţa mecanică

Principiu: se urmăreşte rezistenţa eritrocitelor la o anumită solicitare mecanică (agitare cu perle de sticlă), exprimată prin gradul de hemoliză citit la fotometru la valoarea absorbţiei maxime a oxihemoglobinei şi exprimat în procente.

Valori normale: gradul de hemoliză sub 15%

Valori scăzute de rezistenţă mecanică: gradul hemolizei peste 15% în anemii hemolitice; talasemii (în ciuda rezistenţei osmotice crescute).

8. Viteza de sedimentare a hematiilor (VSH)

Principiu: Din sângele recoltat pe anticoagulant (citrat de Na 3,8%), aspirat într-o pipetă gradată (Westergreen) şi lăsat în repaus, hematiile se sedimentează cu o viteză variabilă. Valorile VSH se citesc la 1 şi 2 ore pe gradaţia pipetei fixată perpendicular.

Valori normale:
Bărbaţi: 2/4 mm
Femei: 6/12 mm

Valoarea VSH este determinată de factori eritrocitari şi plasmatici.

Factori eritrocitari: anemiile (accelerează)
poliglobulia (reduce)

Factori plasmatici: proteinele plasmatice aderente (adezinele, reactanţii de fază acută, ca fibrinogenul, fibronectina, ceruloplasmina, haptoglobina, proteina C-reactivă etc.), prin fixarea lor pe suprafaţa hematiilor.

Valoarea VSH creşte în: inflamaţii acute şi cronice (tbc activă, reumatism poliarticular acut şi cronic, boli infecţioase, septicemii, hemopatii, tumori maligne, infarct miocardic etc.).

9. Numărul reticulocitelor. Reticulocitoza.

Principiu: Reticulocitele se pun în evidenţă prin coloraţii vitale (albastru brilliant de crezil) numărându-se procentajul reticulocitelor întâlnite pe frotiul colorat la 1 000 de hematii.

Valori normale: 3-10‰

Valori crescute: anemii hemolitice, după hemoragii (semn de răspuns pozitiv la hemoterapie)

Valori scăzute: anemii hipo- şi aplastice, hiporegenerative

10. Explorarea de laborator a hemoglobinopatiilor

Sângele se recoltează pe anticoagulant. Hematiile se spală cu ser fiziologic până la îndepărtarea completă a proteinelor plasmatice. Hematiile se hemolizează (cu apă distilată sau saponină), hemolizatul se centrifughează. Pentru analiza hemoglobinei se foloseşte supernatantul roşu, transparent.

a) Determinarea hemoglobinei alcalinorezistente (HbF)

Hemoglobina fetală (HbF) rezistă la efectul denaturant al soluţiei de NaOH 0,12 n. Se determină fotometric hemoglobina din hemolizat înainte şi după denaturare alcalină, exprimând diferenţa în procente:

HbAR (HbF) < 0,3% (din Hb totală)

Valori crescute: Talasemii (anemiile Cooley)

b) Studiul solubilităţii hemoglobinelor

Diferite tipuri de hemoglobină prezintă solubilităţi diferite în amestecuri de două soluţii tampon fosfat (2,24 mol/l şi 2,58 mol/l). În tamponul fosfat 2,24 mol/l toate tipurile de Hb sunt solubile, cu excepţia HbS. Solubilitatea celorlalte tipuri în tamponul fosfat 2,58 mol/l variază după natura hemoglobinei.

Rezultate:

În tamponul fosfat 2,24 mol/l formarea unui precipitat arată prezenţa HbS. Se determină cantitatea de Hb rămasă dizolvată în supernatant (în ‰):

0,1-0,95 g‰ = drepanocitoză SS

1,25-2,2 g‰ = drepanocitoză AS

0,9-1,2 g‰ = hemoglobinoză SC

mai solubilă decât SS = hemoglobinoză SAF

În tamponul 2,58 mol/l apare în mod constant un precipitat, care se datorează celorlalte Hb. Citirea fotometrică a densităţii optice a filtratului arată următoarele valori:

– hemoglobina normală de adult AA= 2,5 g‰

– hemoglobina DD sau AD= idem

– hemoglobina CC= 3,5 g‰

– hemoglobina AC= 1,75-2,1 g‰

– talasemia: variază în funcţie de concentraţia HbF. Prezenţa HbF în hemolizat poate fi pusă uşor în evidenţă cu ajutorul serului monospecific anti-HbF, prin dublă imunodifuzie în gel (*Ouchterlony*).

Diferitele tipuri de Hb normale şi patologice pot fi diferenţiate pe baza variaţiei vitezei lor de migrare electroforetică în gel de amidon sau poliacrilamidă.

11. Explorarea de laborator a anemiilor hemolitice enzimopenice

a) Deficienţa glucozo-6-dehidrogenazei. Testul calitativ (Motulsky, Campbell): se urmăreşte decolorarea albastrului brillant-crezil în sângele recoltat pe anticoagulant şi incubat la 37° C. Probele care se decolorează complet până la 100 min. sunt considerate normale. Probele care nu se decolorează la 3-6 ore sunt considerate deficitare sau lipsite de activitatea G-6-PD.

b) Testul semicantitativ, prin reducerea Hb (Brewer): Hb oxidată în hemiglobină (metHb) de către nitritul de Na, se reduce din nou în prezenţa albastrului de metilen şi a G-6-PD. În absenţa enzimei, reversibilitatea reacţiei dispare. Proba se citeşte în comparaţie cu un tub conţinând sânge normal şi cu unul sigur pozitiv. Cu ajutorul testului Brewer se pot diferenţia şi heterozigoţii.

12. Dozarea siderofilinei

Se face din ser, cu ajutorul imunoplăcilor monospecifice (imunodifuzie radială, *Mancini*) sau fotometric cu metoda ELISA.

Valori normale: 55-75 μmol/l (2-3 g/l)

Valori crescute: sideropenie, graviditate, hemoragii

Valori scăzute: atransferinemie, infecţii, inflamaţii, anemii hemolitice, sindrom nefrotic, neoplazii, ciroză hepatică

C. Explorarea seriei leucocitare

1. Numărul leucocitelor: leucograma cantitativă

Tehnica: ca şi la hemogramă, folosind soluţia hemolizantă Türk şi pipeta diluantă 1/10. Numărătoarea se face fie în camera Bürker, fie într-un numărător automat mult mai precis şi exact.

Valori normale: 5 000-7 000/mm^3

Valori crescute (leucocitoză): peste 9 000/mm^3

Valori scăzute (leucopenie): sub 3 000/mm^3

2. Formula leucocitară

Principiu: Procentajul relativ al diferitelor elemente leucocitare, citit la microscop din 100 de elemente ale unui frotiu colorat cu *May-Grünwald-Giemsa*.

Valori normale:

Granulocite neutrofile nesegmentate:	1-4%
Granulocite neutrofile segmentate:	50-60%
Granulocite eozinofile:	1-4%
Granulocite bazofile:	< 1%
Monocite:	5-6%
Limfocite:	28-35%

Valori patologice:

• Deviere la stânga: neutrofilie nediferenţiată, limfo- şi monocitopenie, eozinopenie: reacţie de fază acută.

• Deviere la dreapta: neutrofilie diferenţiată

• Devieri caracteristice ale tabloului sanguin:

Boala Bang: leucopenie cu limfo- şi monocitoză

Eritemul nodos: leucocitoză cu eozinofilie

Febra tifoidă: leucopenie cu limfocitoză relativă

Hepatita epidemică (HA), rubeola: leucopenie cu limfocitoză (reticulară)

Malaria: leucopenie cu monocitoză

Mononucleoza (VEB): leucopenie cu limfo- şi monocitoză importantă

Rujeola: leucopenie cu monocitoză

Scarlatina: leucocitoză cu eozinofilie

Tbc miliară: leucopenie, limfopenie

Tusea convulsivă: leucocitoză, limfocitoză

Eozinofilie marcantă: stări carenţiale, alergii, parazitoze, scarlatină, b. Hodgkin, leucemie mieloidă cronică, policitemie, miozită, imunopatii cronice evolutive, eritem nodos

3. Reacţia peroxidazelor

Celulele seriei granulocitare (începând cu promielocitul) conţin peroxidaze. Punerea în evidenţă a peroxidazelor în elementele figurate albe ale sângelui permite diferenţierea între elementele mieloide şi cele limfocitare.

4. Punerea în evidenţă a fosfatazei alcaline (PA) leucocitare

În prezenţa enzimei PA, α-glicerofosfatul se scindează în glicerat şi fosfaţi, care în urma transformării lor în fosfaţi de cobalt se precipită în prezenţa sulfurii de amoniu sub formă de sulfură de cobalt, de culoare neagră.

Interpretare: în mod normal, granulocitele neutrofile polimorfonucleare (PMN) prezintă o slabă activitate de fosfatază alcalină. Această activitate este mult crescută în reacţiile leucemoide, ca în infecţii acute, tbc, tumori maligne, policitemie adevărată. Dimpotrivă, în leucoza mieloidă activitatea fosfatazică este mică sau absentă.

5. Punerea în evidenţă a glicogenului (reacţia PAS)

Principiu: acidul periodic transformă prin oxidare grupările hidroxilice ale hexozelor în radicali carbonilici, care trec prin oxidare leucofucsina bazică incoloră (reactivul *Schiff*) în colorant roşu. Prin reacţia PAS se colorează şi mucine, glicoproteine, cerebrozide, chiar şi fibrina. Pentru confirmare se face şi o probă de control, în care glicogenul a fost descompus de α-amilaza.

Interpretare: celulele din seria granulocitară dau reacţia pozitivă. O reacţie PAS intens pozitivă dă limfoblastul din leucoza acută, la care apar şi numeroase granulaţii citoplasmatice, spre deosebire de mieloblast, a cărui citoplasmă apare roz-palid difuză, însă fără granulaţii.

6. Mielograma

Materialul extras prin aspiraţie cu seringa din măduvă se întinde pe o lamă în frotiu cât mai subţire, se usucă şi se colorează cu MGG.

– *Numărătoarea elementelor nucleare din măduvă*: se procedează ca în cazul leucogramei cantitative.

Valori normale: 70 000-100 000 elemente/mm^3

Valori crescute: leucoze, poliglobulii

Valori scăzute: aplazii medulare

– *Formula medulară*: reprezintă raportul procentual al elementelor seriilor medulare: granulocitară, eritrocitară, trombocitară şi reticulo-histiocitară. Pentru uz curent se numără 100 (pentru o exactitate mai mare, 500) de elemente granulocitare, seriile eritrocitară şi reticulară raportându-se la aceste 100 (500) elemente.

Valori normale:

a) Seria granulocitară:	%
mieloblaşti	0,5-1,5
promielocite	1,0-4,0
neutrofile	14-20
mielocite eozinofile	0,5-3,0
bazofile	-
neutrofile	10-15
metamielocite eozinofile	-
bazofile	14-26
nesegmentate eozinofile	-
neutrofile	10-25
segmentate eozinofile	1-4
bazofile	0,5-1
b) Seria eritrocitară normală:	
proeritroblaşti	0,8-3,0
eritroblaşti bazofili	6,0-8,0
eritroblaşti policromatofili	14-16
eritroblaşti ortocromatofili	8-10
promegaloblaşti	-
c) Seria megaloblastică:	
megaloblaşti bazofili	-
policromatofili	-
ortocromatofili	-
d) Seria trombocitară:	
megacariocite	0,2-2,0
e) Elemente reticulohistiocitare	8,0-12
f) Seria limfocitară:	
limfoblaşti	-
limfocite mici	1,0-5,0

g) Seria monocitară:
monocite 0-2,0
Interpretare:
Măduvă hiperplazică: creşterea numărului de elemente medulare, fie global, fie pe o serie anumită
Măduvă hipoplazică: anemii hiporegenerative
Măduvă aplazică: anemii aplastice, pancitopenii
Măduvă megaloblastică: anemia Biermer, anemiile megaloblastice nebiermeriene
Sideroblaşti medulari (eritroblaşti conţinând fier neheminic): 20-25% din totalul eritroblaştilor. Creşterea numărului sideroblaştilor până la 100% (*sideroblastoză*) apare în anemii hipocrome hipersideremice acrestice (prin lipsă de utilizare a fierului).

D. Explorarea seriei plachetare

1. Numărătoarea plachetelor

a) Metoda indirectă (*Fonio*): se stabileşte procentajul trombocitelor faţă de hematii, pe un frotiu colorat.

b) Metoda directă (*Feissly* sau *Christensen*): plachetele se numără ca şi hematiile, fie cu folosirea pipetei diluante roşii, fie în aparate de numărat particule.

Valori normale: 150-300 000 plachete/mm^3
Valori crescute: trombocitemii (primitive şi secundare, mieloproliferative)
Valori scăzute: trombocitopenii (idiopatice: b. Werlhof; şi secundare: consum sporit, hipersplenism, autoimunopatii, radiaţii)

2. Timpul de sângerare (TS)

Se măsoară timpul ce trece până la oprirea spontană a unei mici sângerări provocate după o înţepare uşoară.

Valori normale:
La lobul urechii: 2-4 min. (Patologic: peste 6 min.)
La pulpa degetului: 2,5-3,0 min. (Patologic: peste 4 min.)
Valori crescute: în trombocitopenii, trombopatii ereditare (Glanzmann) sau secundare (imune, autoimune sau toxice)

3. Morfologia plachetelor

Se apreciază pe un frotiu colorat aspectul, forma, dimensiunile, gruparea plachetelor.

4. Retracţia cheagului

Într-o eprubetă conică gradată se introduc 5 ml sânge recoltat prin puncţie venoasă şi se pune imediat în baie de apă la 37° C. Se citeşte după 4 şi 24 de ore.

Interpretarea: în mod normal, după 4 ore, cantitatea de ser formată reprezintă circa 30-45% din volumul total al sângelui.

Retracţie slabă sau absentă: trombocitopenii, trombocitopatii, poliglobulii.

5. Agregabilitatea plachetară

Prin sedimentarea spontană a sângelui recoltat pe anticoagulant, hematiile şi leucocitele se sedimentează rapid. Plasma supernatantă rămâne însă bogată în plachete (*Platelet Rich Plasma, PRP*). Pentru explorarea în *vitro* a funcţiilor plachetare se utilizează PRP. Determinarea agregabilităţii se face cu apreciere macroscopică a capacităţii de a se agrega în prezenţa unei cantităţi de 2 ng/ml ADP (sau a altei substanţe agregante, ca adrenalina, serotonina, colagen) adăugată la PRP.

Interpretare: plachetele normale, în mod normal, în prezenţa ADP prezintă o agregare în 10-15 sec.

6. Adezivitatea plachetară

Sângele recoltat pe anticoagulant, se lasă să se scurgă printr-un tub din material plastic, umplut cu perle de sticlă. După 50 de secunde se determină numărul plachetelor din sângele scurs din tub. Diferenţa între valoarea găsită înainte şi după scurgere exprimă valoric capacitatea adezivă a plachetelor circulante.

Valori normale: între 26 şi 60% adezivitate

Valori scăzute: până la zero (trombastenie, boala von Willebrand, metaplazie mieloidă, anemia Biermer, autoimunopatii cronice)

Valori crescute: inflamaţii, stări de şoc

II. Explorarea de laborator a hemostazei

A. Explorarea de laborator a fazei vasculoplachetare

Rezistenţa capilară

a) Metoda prin compresiune (semnul garoului Rumpell-Leede)

Principiu: crearea unei staze venoase favorizează extravazarea hematiilor prin peretele capilar în ţesutul subcutanat. Garoul se aplică deasupra plicii cotului, presiunea iniţială mare scade până la apariţia uşoară a pulsului şi se menţine aşa timp de 10 minute. Se notează apariţia peteşiilor, cu 1-4 cruci, după număr şi intensitate.

b) Metoda prin depresiune

Se efectuează cu ajutorul unei ventuze cuplate cu o pompă de vid de mână, care indică şi valoarea cifrică a presiunii negative. Se produce lent un

vid de -400 mmHg (53 332 Pa) şi se menţine un minut. Dacă sub ventuză apar peteşii se aplică pe o regiune învecinată un vid de -300 mmHg (39 990 Pa), respectiv unul de -200 mmHg (26 660 Pa). Un număr mai mic de peteşii înseamnă test negativ. Peteşii în număr de 3-10 se notează cu 1-2 cruci, iar echimoze cu 3 cruci.

Interpretare: o fragilitate vasculară crescută se întâlneşte în trombocitopenii, în angiopatii diabetice, boli hepatice, hipofibrinogenemie, avitaminoză (şi antivitaminoză) K, scorbut. În explorarea acestei faze se cuprinde şi *explorarea seriei plachetare*.

B. Explorarea de laborator a fazei plasmatice (a coagulării propriu-zise)

Testele de coagulare se împart în *teste globale* şi *diferenţiate* pe cele 3 faze ale coagulării: *prefaza* (generarea tromboplastinei plasmatice respectiv tisulare), *faza I*: formarea trombinei şi *faza a II-a*: formarea cheagului de fibrină, inclusiv stabilizarea cheagului şi fibrinoliza. Cu excepţia determinării timpului de coagulare venoasă, pentru explorarea de laborator a coagulării, sângele venos se recoltează pe anticoagulant sau în vase siliconate.

a) Testele de coagulabilitate globală

1. Timpul de coagulare venoasă (Lee, White)

Direct de la acul introdus în vena cotului se repartizează în 2 eprubete câte 1 ml sânge şi eprubetele se pun imediat în baie de apă la 37° C. Pornind cronometrul, din minut în minut, eprubeta nr. 1 este examinată prin înclinare la 45°. În momentul când eprubeta poate fi complet răsturnată cu cheagul format se citeşte valoarea timpului de coagulare venoasă. Sângele din eprubeta a doua, lăsată nemişcată, coagulează mai târziu. Citirea se continuă până când apare cheagul difuz şi în eprubeta a doua.

Valori normale:
6-10 minute în prima eprubetă
8-12 minute în a doua eprubetă
Interpretare: prescurtare = hipercoagulabilitate
prelungire = hipocoagulabilitate
necoagulare = coagulopatii congenitale, de consum, exces de anticoagulant.

2. Timpul de recalcificare (Howell)

Coagularea plasmei lipsită de calciu (oxalatată) la adăugarea clorurii de Ca, demonstrează că plasma oxalatată conţine toţi factorii necesari coagulării. La 0,2 ml plasmă oxalatată sau citratată, ţinută la baie de apă de 37° C, se adaugă 0,2 ml clorură de Ca mol/40. Din acest moment se controlează apariţia cheagului opalescent din 15"-15", pe urmă din 10" în 10".

Valori normale: 1'10"-2'10"
Interpretare: identică ca pentru timpul de coagulare

3. Toleranţa la heparină în vitro (Soulier)

Se măsoară timpul de recalcificare a plasmei oxalatate în prezenţa unor cantităţi crescânde (0,3, 0,7 şi 1,0 U) de heparină, în comparaţie cu plasma nativă.

Valori normale: Proba martor (fără de heparină): 2'30"
Proba cu 0,3 U heparină: 4'-5'
Proba cu 0,7 U heparină: 6'-8'
Proba cu 1,0 U heparină: 10'-12'

Adăugând aceeaşi cantitate (1,0 U) de heparină la o plasmă normală şi la cea de cercetat, se poate calcula:

4. Indicele de coagulabilitate (IC)

prin folosirea formulei:

$$IC = \frac{\text{timp martor}}{\text{timp bolnav}} = 0{,}8 - 1{,}2 = \text{izocoagulabilitate}$$

valori sub 0,8= hipocoagulabilitate
valori peste 1,2= hipercoagulabilitate

Testul de toleranţă la heparină, inclusiv indicele de coagulabilitate, este indicatorul cel mai fidel al stărilor de hiper- şi hipocoagulabilitate. Împreună cu timpul de protrombină (*Quick*) este metoda potrivită şi sigură de supraveghere a hipocoagulabilităţii produse terapeutic.

b) Explorarea de laborator a prefazei coagulării

Se face fie prin *teste globale*, fie prin determinarea diferenţiată a *factorilor individuali* care intervin în această fază.

→ Teste globale

1. Testul consumpţiei de protrombină (consumul de protrombină)

În cursul coagulării, protrombina din plasmă se consumă într-o proporţie de 90%, restul de 10% fiind decelabilă în serul format după retracţia cheagului. În caz de *consum scăzut* de protrombină (*hipocoagulabilitate*), serul conţine cantităţi mai mari de protrombină. Se face o testare a timpului de protrombină din serul adăugat cu plasma inactivată (ca sursă de fibrinogen).

Valoarea normală: utilizând plasmă adsorbită ca sursă de fibrinogen: > 30"

Valori patologice: sub 30" indică un consum redus de protrombină în cursul coagulării şi deci prezenţa în ser a unei cantităţi mai mari de protrombină reziduală

Cauzele consumului redus de protrombină:

– deficienţă în formarea tromboplastinei endogene (deficienţa factorilor V, VIII = hemofilie-A, F-IX = hemofilie-B, F-X, XI, XII = trombocitopenii, PF3 = trombocitopatii),

– anticoagulanţi circulanţi,
– erori tehnice (recoltare, termostatare)

2. Timpul de cefalină

Cefalina, având efecte similare cu cele ale PF3, poate corecta timpul de recalcificare alungit al plasmei în cazuri de trombocitopenie sau trombocitopatie.

Interpretare: dacă cefalina aduce la normal timpul de recalcificare al plasmei de bolnav, deficienţa este *de origine plachetară* (trombocitopenie, trombocitopatie). Dacă timpul de recalcificare alungit al plasmei de bolnav *nu se corectează* prin cefalină, deficienţa este *de origine plasmatică* (hemofilie, alţi factori deficitari, anticoagulanţi circulanţi).

3. Determinarea tipului de hemofilie

Principiu: se corectează timpul de coagulare alungit al sângelui integral sau timpul de recalcificare al plasmei bolnavului, cu diferite preparate de compoziţie cunoscută, care conţin sau nu factori antihemofilici.

a) Corectarea timpului de coagulare alungit al sângelui integral:

Se iau 4 tuburi serologice şi se pipetează succesiv câte 0,1 ml din plasmă normală (izogrup) proaspătă (1, conţinând F-VIII, IX, XI), plasmă normală (izogrup) proaspătă adsorbită (2, conţinând F-VIII, XI), ser normal (4-5 zile) vechi (3, conţinând F-IX, XI) şi suspensie activă de cefalină (4).

b) Corectarea timpului de recalcificare alungit al plasmei:

Prin determinarea timpului de recalcificare în cele 4 tuburi, în comparaţie cu plasma netratată a bolnavului, se pot trage următoarele concluzii:

Hemofilia-A: 1 şi 2 corectează, 3 şi 4 (cefalina) nu corectează,

Hemofilia-B: 1 şi 3 corectează, 2 şi 4 nu corectează,

Hemofilia-C (deficienţă PTA=XI): 1, 2 şi 3 corectează, cefalina nu corectează.

→ Teste diferenţiate

Testul de generare a tromboplastinei (Biggs, Douglas)

Cu ajutorul a 5 reactivi: 1. suspensie de plachete, 2. plasmă lipsită de plachete, 3. plasmă adsorbită cu sulfat de bariu (conţine F-VIII, XI şi V), 4. ser de 24 de ore (conţine F-IX, XI şi X) şi 5. clorură de Ca mol/40, face posibilă identificarea individuală a deficienţei (lipsei) factorilor V, VIII, IX, X, XI şi XII, precum şi a PF3.

La o plasmă substrat, lipsită de plachete şi repartizată în 8 eprubete separate, se adaugă cu intervale de un minut volume egale dintr-un amestec conţinând suspensie plachetară, plasmă adsorbită, ser de 24 ore şi clorură de Ca mol/40 şi se determină timpii de coagulare. În cazul unei plasme normale, timpul cel mai scurt (10") de coagulare apare după 4-5 minute de incubaţie a mixturii coagulante. Apoi se trece la înlocuirea plasmei adsorbite şi a serului proaspăt normal cu derivaţi ai sângelui bolnavului.

– Dacă introducerea plasmei adsorbite a bolnavului nu duce la prelungirea timpului de coagulare, nu există nici o deficienţă a factorilor VIII şi V. În caz de prelungire, este vorba de o deficienţă fie a factorului VIII, fie a factorului V. Diagnosticul se precizează prin determinarea diferenţială a FV.

– Dacă se introduce serul proaspăt al bolnavului şi nu apare nici o deosebire între timpurile de coagulare citite, nu există nici o deficienţă a factorului IX sau X. În caz de prelungire este vorba de o deficienţă (lipsă) a factorului IX sau X. Pentru precizare se determină factorul X sau se efectuează timpul de protrombină (Quick), care este prelungit în deficienţa de factor X, dar este normal în hemofilia B.

– Înlocuind suspensia plachetară normală cu cea obţinută de la bolnav se pune în evidenţă deficienţa factorului 3 plachetar (PF3).

– Prin înlocuirea succesivă a mixturii martor, plasmă adsorbită şi serul proaspăt cu cele ale bolnavului, se pot constata deficienţe ale factorului XI.

c) Explorarea de laborator a fazei I a coagulării plasmatice

În cursul fazei I a coagulării plasmatice are loc transformarea protrombinei în trombină. Această fază se studiază cu ajutorul coagulării extrinseci (prin explorarea tromboplastinoformării exogene) şi se bazează pe determinarea activităţii complexului protrombinic format din următorii factori: protrombina (II), proconvertina (VII), factorul Stuart-Prower (X) şi accelerina (V). Explorarea fazei I a coagulării plasmatice se face fie prin *teste globale,* fie prin *determinarea diferenţiată* a fiecărui factor în parte.

→ **Teste globale**

1. Timpul de protrombină (Quick, TQ)

Principiu: în prezenţa tromboplastinei tisulare (TPT) şi a clorurii de calciu, plasma normală se coagulează rapid (în 10-18"), ocolind prefaza (intrinsecă). Prin urmare, TQ nu semnalează nici un deficit al factorilor din această fază (hemofilii, afecţiuni plachetare).

Valori crescute: hipocoagulabilitate (anticoagulanţi, deficienţele ereditare şi dobândite ale factorilor complexului protrombinic)

Valori scăzute: hipercoagulabilitate prin transformarea sporită a protrombinei.

2. Valoarea procentuală a protrombinei ("indicele protrombinic")

Principiu: se compară timpul de protrombină (TQ) al plasmei cercetate cu timpii obţinuţi cu o plasmă normală diluată succesiv de la 9:1 până la 1:9, corespunzând activităţii protrombinice de 90, 80 ... 20, 10% a plasmei normale, valorile normale fiind de 80-100%. Pe baza discordanţelor existente între cantitatea şi funcţiile factorilor complexului protrombinic, recent s-a renunţat la determinarea indicelui protrombinic; în schimbul acestuia se indică valorile TQ obţinute cu plasma bolnavului şi cu una normală.

→ **Teste diferenţiate pentru factorii individuali**

Principiu: se face un amestec al tuturor factorilor complexului protrombinic, cu excepţia celui care se determină. Ca urmare, variaţiile timpului de coagulare măsurat depind numai de factorul cercetat.

1. Determinarea protrombinei singure

Principiu: plasma normală diluată 1:10 se amestecă cu plasmă normală adsorbită cu sulfat de bariu (sursă de fibrinogen şi de FV), ser normal vechi (sursă de FVII şi FX) şi se determină timpul de coagulare în prezenţa tromboplastinei tisulare şi a ionilor de calciu.

Valori normale: 25-35"

Valori crescute: hipoprotrombinemie, avitaminoză (antivitaminoză) K

2. Diferenţierea proconvertinei şi a factorului X: timpul Stypven

Principiu: veninul de viperă Russell are o tromboplastină parţială (Stypven) care coagulează plasma în absenţa factorului VII, dar solicită prezenţa factorilor V, X şi PF3.

Valori normale: se compară cu cele obţinute la plasma normală

Valori alungite: deficienţă de factor X, trombocitopenii, trombocitopatii

Valori scurtate: trombocitoze hiperlipidemii

3. Determinarea factorului V

Principiu: plasma de cercetat diluată 1:10 se amestecă cu plasma normală veche (sursă de fibrinogen, protrombină, proconvertină şi FX, dar lipsită de FV) şi se determină timpul de coagulare în prezenţa ionilor de Ca şi a tromboplastinei. Factorul V fiind labil, determinarea trebuie să se efectueze în prima oră după recoltare.

Valori normale: 20"-25"

Valori alungite: deficienţe câştigate, secundare în FV: sindrom de coagulare intravasculară diseminată (CIVD), fibrinoliză primară sau secundară. Deficienţe ereditare: foarte rare.

d) Explorarea fazei a II-a a coagulării plasmatice

1. Dozarea fibrinogenului

Principiu: în prezenţa clorurii de Ca, fibrinogenul plasmatic se transformă în fibrină cu ajutorul unei soluţii de trombină în exces. În urma îndepărtării prin spălare a proteinelor plasmatice, cheagul se dizolvă într-o soluţie de NaOH şi se determină fotometric cantitatea fibrinei (prin citirea densităţii optice la 280 nm; cu ajutorul reacţiei biuretului; cu reactivul fenolic Folin-Ciocâlteu etc.).

Valori normale: 2-4 g/l.

2. Timpul de trombină

Principiu: adăugând trombină pe o probă de plasmă, se poate explora fibrinoformarea, primele 2 faze ale coagulării fiind suprimate. Se determină

timpul de coagulare al unei plasme normale în comparaţie cu cele de la bolnav.

Valori alungite (diferenţe mai mari de 5" între martor şi plasma de cercetat): hipo- sau afibrinogenemii secundare (de consum) sau congenitale, anticoagulanţi circulanţi.

3. Cercetarea factorului de stabilizare a fibrinei (FXIII, FSF)

Principiu: plasma oxalatată sau citratată este coagulată prin recalcificare, iar cheagul format se tratează cu o soluţie de uree 5 mol/l (sau de acid monocloracetic 10 g/l) în care fibrina normală este insolubilă, dar fibrina nestabilizată (din cauza scăderii sau lipsei FSF) se solubilizează. Cu ajutorul metodelor RIA şi ELISA, cantitatea FSF în plasmă poate fi determinată cu mare precizie şi exactitate.

Rezultate: spre deosebire de fibrina stabilizată, cheagul format în lipsa FSF se redizolvă complet în 2-3 ore în soluţia de uree 5 mol/l şi în cca. 15 min. în soluţia de acid monocloracetic 10 g/l.

e) Explorarea fibrinolizei

1. Dozarea fibrinogenului (vezi II, B, d, 1)

2. Coagularea sângelui integral la 37° C şi liza cheagului

– Sânge incoagulabil: coagulopatie prin consum hiperacut.

– Coagulare cu liză ulterioară:liza apare la mai puţin de ooră = sindrom acut, liză parţială = sindrom cronic sau latent,

– Sângele coagulează rapid (2-4 min.): semn caracteristic pentru faza iniţială a coagulării intravasculare diseminate (CIVD).

3. Proba cu inhibitor al plasminei

Principiu: în două tuburi se pun câte 1 ml de sânge de la bolnav, în tubul al doilea se mai adaugă şi 1 ml soluţie 100 g/l de acid aminocaproic (EACA) sau alt inhibitor al plasminei (PAMBA, AMCHA). Urmărind coagularea şi liza cheagului la 37° C, apariţia şi redizolvarea rapidă a cheagului în tubul lipsit de inhibitor pledează pentru o activitate fibrinolitică crescută.

4. Proba cu trombină

Dacă la sângele necoagulabil se adaugă câteva picături de trombină dizolvată şi tot nu se coagulează, există două posibilităţi: scăderea pronunţată sau chiar dispariţia fibrinogenului în urma unui consum rapid (CIVD şi/sau fibrinoliză); prezenţa unui anticoagulant circulant de tipul antitrombinelor (de obicei heparina în doze excesive). Această deficienţă se corectează printr-un adaos de sulfat de protamină.

5. Testul euglobulinelor (liza euglobulinică)

Principiu: diluarea plasmei la 1:20 cu acid acetic 10 g/l, precipită euglobulinele (inclusiv fibrinogenul, plasminogenul şi activatorul lui),

amiplasminele rămânând în supernatant. Cheagul euglobulinic (lipsit de antiplasmine) se lizează mai repede. Proba se efectuează paralel cu un martor (plasmă normală).

Valori normale: timpul de coagulare normal al plasmei este de 1'45"-2'. Scurtarea timpului indică o hipercoagulabilitate, iar prelungirea lui o hipofibrinogenemie.

Liza normală a cheagului euglobulinic se produce după 60 min. În condiţii patologice:

– liză în mai puţin de 15 min.: fibrinoliză excesivă
– liză în 15-30 min.: fibrinoliză acută
– liză în 30-60 min.: fibrinoliză latentă

În caz de incoagulabilitate (lipsă, respectiv consum total de fibrinogen) se adaugă la plasma cercetată 0,2 ml de soluţie de fibrinogen 5 g‰ şi o picătură de soluţie de trombină pură şi se urmăreşte timpul de formare, respectiv de liză a cheagului euglobulinic.

6. Cercetarea produşilor de degradare a fibrinogenului (fdp) şi a fibrinei (FDP)

– Din plasmă: testul cu sulfat de protamină

Principiu: produşii de degradare ai fibrinogenului şi ai fibrinei (fdp, respectiv FDP, cu fragmentele X, Y, D şi E) în prezenţa monomerilor de fibrină (ce rezultă din acţiunea trombinei asupra lui) formează complexe solubile care precipită în prezenţa sulfatului de protamină 10 g/l. În urma precipitării, densitatea optică a probei citită la 620 nm creşte proporţional cu cantitatea fdp.

Valori normale: în plasmă E = 0,300, în ser E = 110

Produşii de degradare ai fibrinei (FDP) spre deosebire de fdp, în urma acţiunii FSF conţin şi *dimeri* ai fragmentelor D (*dimeri-D*), decelabili în plasmă şi urină cu ajutorul metodelor RIA sau ELISA

– Din urină: testul fotometric

Principiu: fdp, având dimensiuni moleculare mici, trec uşor prin filtrul glomerular şi se elimină prin urină. În urina adunată în 2-3 ore se calculează valoarea diurezei pe minut (0,8-1,2 ml/min.). Proteinele eventual prezente în urină se precipită cu acid tricloracetic concentrat la rece, iar din supernatant se determină cantitatea fdp cu ajutorul metodei *Folin-Lowry*.

Valori normale: 6-12 ng/min.

Valori crescute: hiperfibrinoliză (secundară, primară)

7. Cercetarea monomerilor de fibrină

– Testul cu alcool etilic

Principiu: alcoolul etilic, în condiţii de concentraţie, pH şi temperatură, produce în cazul unei hiperprotrombinemii endogene, în prezenţa monomerilor de fibrină, gelificarea plasmei. Gelificarea *nu apare* cu fdp.

Rezultate: gelificarea plasmei apare în CIVD şi lipseşte în fibrinoliza primară.

– Timpul cu reptilază

Reptilaza este enzima proteolitică din veninul de viperă braziliană (*Bothrops jarararca*), care pune în libertate din fibrinogen fibrinopeptidul-A şi monomeri de fibrină. Spre deosebire de trombină, reptilaza nu este influenţată de heparină. Se urmăreşte timpul de coagulare al plasmei în prezenţa reptilazei.

Valori normale: timp de coagulare = 20"-30"

Valori alungite:– scăderea cantităţii fibrinogenului sub 1 g/l.

– polimerizarea anormală a monomerilor de fibrină în prezenţa unor proteine patologice (plasmocitom) sau a unor polimeri artificiali (dextran, insulină),

– disfibrinogenemii (cu anomalii structurale),

– CIVD cu hipofibrinogenemie uşoară, în prezenţa fdp

f) Cercetarea anticoagulanţilor circulanţi (factorilor inhibitori ai coagulării)

Inhibitori fiziologici: antitrombinele, inhibitorii protromboplastici, tromboplastici şi antiplasmina.

Inhibitorii patologici: apar numai în condiţii patologice şi blochează specific activitatea unui anumit factor, ca anticoagulantul lupic, anticorpii inhibitori ai globulinei antihemofilice (FVIII) etc.

g) Coagulograma

Este un procedeu complex, prin care, cu ajutorul testelor globale şi diferenţiate se urmăresc toate fazele hemostazei, de la faza vasculoplachetară, până la retracţia cheagului şi fibrino(geno)liză. Efectuarea coagulogramei se recomandă numai în cazuri când pozitivitatea unor teste globale indică tulburări într-o fază a hemostazei, a căror precizare este utilă diagnosticului. Nu se face coagulograma la bolnavi în urma transfuziei de sânge sau sub tratament anticoagulant.

h) Tromboelastografia (Hartert)

Cu ajutorul unui instrument cu înregistrare optică (*tromboelastograful lui Hellige*) se urmăresc fazele formării cheagului precum şi calităţile sale în funcţie de timp.

Principiu: într-o cuvă cilindrică inoxidabilă se pune sângele sau plasma recalcificată. Cuva se mişcă lent, cu o perioadă de 9". Un alt cilindru inoxidabil se scufundă în conţinutul cuvei, fiind suspendat pe un fir de torsiune, pe care este fixată o mică oglindă, care reflectă o rază de lumină pe o bandă de hârtie fotografică, ce înaintează cu o viteză constantă. Atât timp cât sângele (sau plasma) este în stare lichidă, cilindrul central nu poate fi antrenat de mişcările cuvei, spotul luminos înscrie deci o linie dreaptă. Când însă sângele începe să coaguleze, mişcarea cuvei se transmite cilindrului suspendat prin intermediul fibrelor de fibrină. Din acest moment se începe înscrierea unei curbe cu două ramuri care se îndepărtează mai mult sau mai puţin rapid. Când cheagul se retrage, această distanţă începe să se retragă şi ea: aspectul general al curbei este acela al unui diapazon. Pe tromboelastogramă se urmăresc: apariţia normală în timp a modificărilor patologice sau absenţa formelor caracteristice ale evoluţiei curbei şi se măsoară dimensiunile în spaţiu şi timp ale acestora.

III. Explorarea parametrilor biochimici din ser

1. Acizii biliari

Steroizi detergenţi (acidul colic, dezoxicolic şi chenodezoxicolic) formaţi în hepatocite şi excretaţi în bilă sub formă conjugată cu glicină sau taurină. În caz de obstrucţie biliară se acumulează în ser şi se elimină prin urină.

Dozare: cromatografie în fază gazoasă, ELISA.
Valori normale în ser: 4,5-7,8 μmol/l (1,5-3,0 mg/l).
Valori crescute: hepatită cronică activă (vasculobiliară), hipercolesterolemie.
Valori excesive: obstrucţie biliară, ciroză hepatică decompensată.

2. Acidul lactic

Produsul degradării anaerobe a glucozei.
Dozare: enzimatică (LDH).
Valori normale: 0,4-1,1 mmol/l (16-58 mg/l).
Valori crescute: travaliu muscular, încordare psihică, sfârşitul graviditaţii, hipoxie, şoc (lactacidoză).

3. Acidul uric

Produsul final al metabolismului purinic.
Dozare: fotometrică, în urma oxidării cu peroxid de hidrogen.
Valori normale: bărbaţi: 214-488 μmol/l (36-82 mg/l)
femei: 137-363 μmol/l (23-61 mg/l).
Valori crescute: gută, retenţie renală, leucemii, anemii biermeriene, infarct miocardic, stări carenţiale, intoxicaţii (CO, Pb, Be, medicamente: aspirină, furosemid, PP).

4. Adrenalina

Mediator adrenergic, hormonul medulosuprarenalelor.
Metodă: cromatografie în fază lichidă de mare performanţă (HPLC).
Valori normale: 8,2 nmol/l (1,5 μg/l).
Valori crescute: excitaţie simpatică, feocromocitom.

5. Alcoolul etilic (etanolul)

Se reabsoarbe din intestin în urma consumului.
Metodă: fotometrică
Intoxicaţie subclinică: 11-21 mmol/l (0,6-1,0 g/l = ‰)
mijlocie: 34-44 mmol/l (1,6-2,0 g/l)
letală: 76-108 mmol/l (> 5 g/l)

6. Aminoacizii

Constituenţi şi produşi de degradare ai proteinelor.

Dozare: în ansamblu ca *azot α-aminic* sau separat, prin cromatografie.

Valori normale: 35-55 mg/l azot α-aminic.

Valori crescute: insuficienţă hepatică acută sau cronică, stări de şoc, arsuri grave, hemoragii gastrointestinale, cetoze, infecţii grave, tratament corticosteroidic excesiv, tulburările ereditare ale metabolismului unor aminoacizi (tirozină, cistina).

Valori scăzute: sindrom nefrotic, stări carenţiale.

7. Amoniacul

Se formează în tubul digestiv sub acţiunea florei microbiene. Se neutralizează în hepatocite prin *ciclul ureei*.

Dozare: fotometrică.

Valori normale: 15-45 μmol/l (400-600 μg/l).

Valori crescute: insuficienţă hepatică gravă acută sau cronică, comă hepatică, tulburările congenitale ale ciclului ureei.

8. Azotul ureic (BUN = Blood Urea Nitrogen)

Conţinutul în azot al ureei din plasmă.

Dozare: fotometrică.

Valori normale: 1,7-8,5 mmol/l (47-273 mg/l).

Valori crescute: insuficienţă renală (uremie), ciroză hepatică, leucemii mieloide.

9. Bilirubina

Produs de degradare al hemului în elementele SMM, extras din plasmă şi excretat în bilă de către hepatocite după conjugare cu acid glucuronic. Reacţia de diazotare este prompt pozitivă cu bilirubina conjugată (*directă*) solubilă şi apare numai în urma acţiunii alcoolului etilic sau a cafeinei cu bilirubina neconjugată, insolubilă (*indirectă*).

Valori normale:

Bilirubina totală: < 17 μmol/l (10 mg/l)
directă: < 10 μmol/l (6 mg/l)
indirectă: < 7 μmol/l (4 mg/l).

Valori crescute: nou-născuţi, obstrucţie biliară (b. directă), leziuni hepatice (b. directă şi indirectă), boli hemolitice (b. indirectă), hiperbilirubinemii de shunt (tulburările biosintezei scheletului heminic).

10. Bromsulftaleina (BSP)

Soluţia 50 g/l de bromsulftaleină administrată i.v. (5 mg/kg corp) se excretă de către hepatocite în bilă. În cazul determinării *coeficientului de epuraţie* a BSP, se determină cantitatea de colorant excretată în curs de 45 de minute.

Valoarea normală: < 5% a cantităţii totale de colorant administrat i.v.

Valori crescute (retenţie de BSP): hepatopatii cronice, ciroză hepatică, stază hepatică, colangite (hepatite vasculobiliare), spasmul sfincterului Oddi.

11. Cisteina şi cistina

Aminoacid tiolic, respectiv disulfidic.

Dozare: fotometrică.

Valori normale: 45-65 μmol/l (13 mg/l).

Valori crescute: boli ereditare (cistinurie, cistinoză).

12. Corpii cetonici

Produşi de degradare ai acizilor graşi: acidul acetil-acetic, ß-hidroxi-butiric şi acetona. Se descompun prin oxidare în hepatocite, miocard şi muşchi.

Valori normale: 100-250 μmol/l (10-25 mg/l).

Valori crescute: diabet zaharat decompensat, acromegalie, sindrom Cushing, după pancreatectomie, glicogenoze, tireotoxicoză, stări hipoglicemice, sub tratament corticosteroidic prelungit.

13. Creatina

Se formează în muşchi scheletali, în miocard şi în rinichi, sub formă de fosfocreatină.

Dozare: fotometrică.

Valori normale: 23-46 μmol/l (4-12 mg/l).

Valori crescute: miozită, distrofie musculară, hipertireoză, artrită reumatoidă.

14. Creatinina

Produsul de degradare al creatininei se excretă (fără reabsorbţie şi secreţie) prin urină.

Dozare: fotometrică.

Valori normale: 35-105 μmol/l (4-12 mg/l).

Valori crescute: producţie excesivă (gigantism, acromegalie), retenţie (insuficienţă renală, uremie, sindrom Crush).

15. Coeficientul de epuraţie a creatininei endogene

Se determină volumul plasmatic epurat de creatinină pe minut, cu ajutorul formulei:

$$\text{Coeficientul de epuraţie} = \frac{\text{Creatinina urinară}}{\text{Creatinina serică}} \text{ ml/min.}$$

Valori normale: 110-130 ml/min.

Valori scăzute: insuficienţa renală acută sau cronică, poliglobulie, pielonefrită.

BCU ASSOCIATE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16. Fenilalanina

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 55-65 μmol/l (8-10 g/l).

Valori crescute: fenilcetonuria, tirozinuria, necroze tisulare.

17. Glucagonul

Hormonul produs în celulele α_2 ale insulelor Langerhans din pancreas şi în porţiunea superioară a tubului digestiv.

Metodă: RIA sau ELISA.

Valori normale: 0,2-0,3 μg/l.

Valori crescute: şoc cardiogen, diabet zaharat (ocazional), sindrom Zollinger-Ellison (rareori).

18. Glucoza din sânge (glicemia)

Metodă: fotometrică enzimatică.

Valori normale: 2,8-5,3 mmol/l (0,5-0,9 g/l).

Valori crescute: diabet zaharat, gigantism (acromegalie), sindromul Cushing, pancreatită acută, stări de şoc, tireotoxicoză, arsuri, stări de *stress*.

Valori scăzute: hiperplazii, adenoame, tumori maligne insulare, sindrom dumping, boala Addison, boala Simmond, hepatopatii toxice, ciroză hepatică (faza terminală), glicogenoze (lipsa enzimei glucoză-6-fosfatază), alcoolism cronic, stări carenţiale, glicozurie renală, leziuni hipotalamice.

19. Hidroxiprolina

Aminoacid constituent al fibrelor de colagen.

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 10-30 μmol/l (1,2-4,0 mg/l).

Valori crescute: boli osteoarticulare (fracturi, tumori, tbc, boala Paget, sindrom Marfan, poliartrite cronice), arsuri, psoriazis, eczeme, hipertireoză, hiperparatireoză, acromegalie, gigantism, ciroză hepatică, malabsorbţie, hiperprolinemie familială (ereditară).

20. Iod legat organic (Protein Bound Iodine, PBI)

Cantitatea de iod prezentă în compuşii activi circulanţi din glanda tiroidă.

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 315-630 mmol/l (40-80 μg/l).

Valori crescute: tirectoxicoză, hepatite acute, tratament cu iod, cu estrogeni, cu anticoncipienţi.

Valori scăzute: hipotireoză, mixedem, stări carenţiale, sindrom nefrotic, ciroză hepatică, tratament cu corticosteroizi, tiocianură, tiouracil, acid para-aminosalicilic, para-aminobenzoic.

21. Prolina

Aminoacid ciclic, constituentul major al colagenului.

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 0,11-0,45 mmol/l (12,8-51,5 mg/l).

Valori crescute: lipsa ereditară a enzimei hepatice prolină-oxidază (hiperprolinemia de tipul I), a pirolidin-5-dehidrogenazei (hiperprolinemia de tipul II), în formele grave (sindrom Joseph) creşte puternic eliminarea renală a prolinei, a hidroxiprolinei şi a glicinei.

22. Renina

Enzimă proteolitică termolabilă din aparatul juxtaglomerular renal. Eliberează din angiotensinogen decapeptidul angiotensina I.

Metodă: RIA, ELISA.

Valori normale: în repaus 5-30 ng/l

după efort 10-65 ng/l.

Valori crescute: hiperaldosteronism secundar, hipertensiune renală, sindrom şi pseudosindrom Bartter, edeme de origine cardiacă, hepatică şi renală, tumoră secretantă de renină.

Valori scăzute: hiperaldosteronism (sindrom Conn), adenom sau hiperplazie corticosuprarenală, nefrectomie, insuficienţă hipofizară.

23. Ureea

Produsul final al metabolismului protidic (al detoxifierii amoniacului).

Metodă: fotometrică enzimatică.

Valori normale: 2,0-8,3 mmol/l (0,15-0,50 g/l).

Valori crescute: producţie sporită (catabolismul proteinelor: febră, septicemii), eliminare renală insuficientă (scăderea circulaţiei renale, insuficienţa renală acută şi cronică, ocluzia căilor urinare), stări de şoc, intoxicaţii .

Valori scăzute: hemodiluţie, insuficienţă hepatică, hemodializă, perfuzii excesive, poliurie.

ECHILIBRUL ACIDO-BAZIC

1. Aciditatea actuală: valoarea pH

Metodă: electrometrică.

Valori normale: 7,37-7,42.

Valori crescute: alcaloză decompensată.

Valori scăzute: acidoză decompensată.

2. Presiunea parţială a bioxidului de carbon în condiţii anaerobe

Metodă: manometrică.

Valori normale: 4,6-6,22 kPa (34,5-46,6 mmHg).

Valori crescute: acidoză respiratorie.

Valori scăzute: hiperventilaţie, alcaloză.

3. Bicarbonaţi standard

Cantitatea bicarbonaţilor în sângele saturat cu CO_2 la o presiune de 5,34 kPa (40 mmHg).

Valori normale: 23,4 mmol/l.

4. Bicarbonaţii actuali

Cantitatea măsurată a bicarbonaţilor în plasmă.

Metodă: electrometrică.

Valori normale: 24,1-25,0 mmol/l.

5. Bază de tampon (Buffer Base, BB)

Aciditatea (sau alcalinitatea) titrabilă a sângelui, alcătuită din bicarbonaţii actuali şi hemoglobină.

Metodă: electrometrică.

Valori normale: 46 mmol/l, din care 23,4 mmol/l bicarbonaţi şi 22,6 mmol/l pentru hemoglobină.

Aciditatea (sau alcalinitatea) titrabilă a sângelui, determinată în condiţii standard.

Valori normale: 46 mmol/l.

6. Exces de bază (BE)

Diferenţa între valoarea actuală a BB determinată la bolnav (BBA) şi cea normală (BBN):

BE = BBA - BBN

Valori normale: între -2,8 şi +3,0 mmol/l.

Valori scăzute negative: acidoză metabolică.

Valori crescute pozitive: alcaloză metabolică.

7. Folosirea valorii BE pentru calcularea cantităţii necesare de bicarbonaţi pentru restabilirea echilibrului acido-bazic tulburat

Se face cu ajutorul formulei lui *Mellemgaard* şi *Astrup*:

Bicarbonaţi mmol/l = BE . 0,3 . kg corp

în care BE = valoarea excesului de bază,

0,3 = coeficientul proporţiei compartimentelor de apă din organism.

ENZIMELE

Biocatalizatori celulari de origine citoplasmatică (*C-enzime*) sau microstructurală (*M-enzime*). Se determină pe baza activităţii lor exprimată în *katal* sau în mU/l respectiv U/l.

1. Alanină aminotransferaza (AAT) sau transaminaza glutamico-piruvică (TGP)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 300 nkat/l (< 20 U/l).

Valori crescute: hepatite acute, insuficienţă hepatică, distrofie musculară progresivă, mononucleoză, arsuri.

2. Aldolaza

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 50 nkat/l (< 3,0 U/l).

Valori crescute: infarct miocardic (în cursul primelor 24-48 ore), miopatii, dermatomiozită, hepatopatii acute şi toxice, pancreatită acută, anemii hemolitice, leucemii, tumori maligne, tetanos.

3. Amilaza

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 2,5 μkat/l (< 300 U/l).

Valori crescute: pancreatită acută sau cronică, parotidită epidemică, anurii (retenţie), salpingite, boli autoimune (*macroamilazemie*), în cursul corticoterapiei sau administrării morfinei.

4. Creatinfosfat kinaza (CPK)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 800 nkat/l (< 50 U/l).

Valori crescute: infarct miocardic (în cursul primelor 24-48 ore), distrofie musculară progresivă, sindromul *Crush*, apoplexie, alcoolism cronic, stări de şoc. Izoenzimele se determină în scopul stabilirii originii tisulare a enzimei (miocardică, musculară).

5. Colinesteraza (pseudocolinesteraza)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 90 μkat/l (< 5 000 U/l).

Valori crescute: enteropatie exudativă, sindrom nefrotic, alcoolism cronic, steatoză hepatică, diabet zaharat cu obezitate, tireotoxicoză.

Valori scăzute: hepatită cronică evolutivă, stază hepatică, colangită, cancer hepatic, mielom multiplu, boala Hodgkin, dermatomiozită, anemii feriprive, anemii biermeriene, nefropatii, şi până la dispariţie: intoxicaţii cu substanţe organofosforice (DFP, ecatox, paration).

6. γ Glutamil-Transpeptidaza (GGTP)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 1 700 nkat/l (< 100 U/l).

Valori crescute: colestază, hepatite toxice (alcoolică, cu halotan, estrogeni, contraceptive, clorpromazin), ciroză hepatică, obstrucţii biliare, pancreatită acută sau cronică, infarct miocardic (din ziua a 3-a, ajungând la maximum în 8-12 zile).

7. Aspartat aminotransferaza (transaminaza glutamic-oxalacetică: TGO)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 350 nkat/l (< 20 U/l).

Valori crescute: infarct miocardic (din ziua a doua), cardită reumatică, hepatite virale, mononucleoză infecţioasă, pancreatită acută, distrofia musculară progresivă, dermatomiozită, embolii pulmonare (apar mai tardiv şi mai lent).

8. Lactat dehidrogenaza (LDH)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 3,5 nkat/l (< 250 U/l).

Valori crescute: infarct miocardic (izoenzima rapidă = LDH-1, după 48-72 de ore), hepatite acute, hepatopatii în urma contraceptivelor, leziuni musculare, anemia biermeriană, leucoze mieloide, metastaze tumorale hepatice (izoenzima lentă, LDH-4), embolie pulmonară.

9. Lipaza (triglicerid-lipaza, TGL)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 2 500 nkat/l (< 160 U/l).

Valori crescute: pancreatită acută (în cea cronică mai puţin), ciroză hepatică, inflamaţii acute şi cronice.

10. Lipoprotein-lipaza (Diacilglicerol-lipaza, DAGL)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 6 000 nkat/l (< 360 U/l).

Valori crescute: pancreatită, inflamaţii acute.

Valori scăzute: ateroscleroză, dislipidemii cu lipemie.

IONOGRAMA

Cationi:

1. Sodiu (Na+)

Metodă: fotometrie de emisie.

Valori normale: 133-147 mmol/l (3,05-3,38 g/l).

Valori crescute: deshidratări, edeme cardiace şi renale, intoxicaţie cu vitamina D, sindrom Dumping.

Valori scăzute: transpiraţii profunde, leziuni tubulare renale, pierderi gastrointestinale (vomă, fistulă, diaree, carenţă de sodiu), intoxicaţie cu apă, hipotermie, infecţii, puncţii repetate, caşexii, ciroză hepatică.

2. Potasiu (*K+*)

Metodă: fotometrie de emisie.

Valori normale: 3,4-4,5 mmol/l (0,13-0,18 g/l).

Valori crescute: hipovolemie (şoc cu acidoză metabolică), hemolize grave, stări hipercinetice, boala Addison.

Valori scăzute: carenţă de potasiu, pierderi gastrointestinale, obstrucţii intestinale, stări de stress, sindrom Cushing, insuficienţă hepatică, hiperaldosteronism, acidoză renală tubulară, hipertireoză, tratament îndelungat corticosteroidic.

3. Calciu (*Ca^{2+}*)

Metodă: fotometrie de emisie.

Valori normale: 2,25-2,65 mmol/l (0,09-0,11 g/l).

Valori crescute: hiperparatiroidism, hipervitaminoză D, tumori şi metastaze osoase; mai rar: mielom, osteoporoză, hipertireoză, hipercalcemie idiopatică, boala Addison, pseudohiperparatiroidism.

Valori scăzute: hipoparatiroidism, D-avitaminoză (rahitism), steatoree, sindrom nefrotic, pancreatită acută, tetanie.

4. Magneziu (*Mg^{2+}*)

Metodă: fotometrie de emisie sau fotometrie.

Valori normale: 0,7-11,1 mmol/l (18-25 mg/l).

Valori crescute: boala Addison, insuficienţă renală acută sau cronică, deshidratări, hipotireoză, hipoaldosteronism.

Valori scăzute: pierderi gastrointestinale, pancreatită acută, alcoolism cronic, comă diabetică, hipertireoză, hiperparatiroidism, hiperaldosteronism, eclampsie, infarct miocardic acut, mielom multiplu, tetanie hipomagneziemică.

Anioni:

1. Cloruri (*Cl^-*)

Metodă: electrometrică.

Valori normale: 94-111 mmol/l (3,3-3,7 g/l).

Valori crescute: deshidratări, acidoză hipercloremică, pierderi de sodiu, alcaloză respiratorie.

Valori scăzute: carenţă de sare, vărsături, hipopotasemie cu alcaloză, transpiraţie excesivă, cetoacidoză diabetică, pierderi renale (tubulare, boala Addison), acidoză respiratorie, intoxicaţie cu apă, pneumonii.

2. Fosfaţi anorganici (*PO_4^{-3}*)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 0,97-1,45 mmol/l (30-45 mg/l).

Valori crescute: hipoparatireoză, acromegalie, D-hipervitaminoză, insuficienţă renală, cetoacidoză diabetică, leucemii.

Valori scăzute: hiperparatireoză, osteomalacie, rahitism, steatoree, sindrom Fanconi, acidoza renală (Albricht), hiperinsulinism, intoxicaţie acută cu alcool, ciroză hepatică, hipopotasemie.

3. Lacuna anionică (Anion Gap, AG)

Diferenţa între suma algebrică a sodemiei şi a potasemiei (exprimată în mmol/l) şi a cloremiei şi a bicarbonaţilor actuali. Exprimă cantitatea în mmol/l a *acizilor neidentificabili*, ce apar în cursul diferitelor stări de acidoză metabolică.

Valori normale: < 17 mmol/l.

Valori crescute: acidoză metabolică.

LIPIDE, LIPOPROTEINE

1. Lipide totale

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 4-8 g/l.

Valori crescute: dislipidemii primare şi secundare, diabet zaharat, mixedem, sindrom nefrotic, alcoolism cronic, pancreatită acută, boala Tangier.

Valori scăzute: hipertireoză, stări carenţiale, infecţii acute, anemii grave.

2. Colesterol total

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 3,878-6,46 mmol/l (1,4-2,4 g/l).

Valori crescute: obstrucţii biliare, ciroză portală, hepatite acute, sindrom nefrotic, pancreatită cronică, diabet zaharat, hipotireoză, hipercolesterolemie familiară, xantomatoză familiară, dislipidemii.

Valori scăzute: hepatopatii grave, uremii, stări septice, hipertireoză, anemii, macroglobulinemie Waldenström, boala Tangier, analfalipoproteinemie, stări carenţiale.

3. Colesterol liber (neesterificat, LDL-colesterol)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 1,94 mmol/l (< 0,75 g/l).

Valori crescute: obstrucţii biliare, ciroză portală, colangite, colangiolite, pancreatită acută, xantomatoză familiară, hipercolesterolemie familiară.

Valori scăzute: ca şi colesterolul total.

4. Colesterol esterificat (HDL-colesterol)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 1,55-2,59 mmol/l (0,6-1,0 g/l).

Valori crescute: ca şi colesterolul total.
Valori scăzute: ciroză hepatică, stări septice.

5. Fosfolipide
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 2,6-3,6 mmol/l (1,5-3,8 g/l).
Valori crescute: ciroză biliară, obstrucţii biliare, sindrom nefrotic, diabet zaharat, hipercolesterolemie familiară.

6. Trigliceride
Metodă: enzimatică fotometrică .
Valori normale: 0,45-1,70 mmol/l (0,4-1,5 g/l).
Valori crescute: dislipidemii, pancreatită, sindrom nefrotic, microvasculite, diabet zaharat, hipotireoză, mixedem.
Valori scăzute: stări carenţiale, hipertireoză, lipodistrofii, anemii grave.

7. Acizi graşi liberi (AGL, neesterificaţi = AGNE, NEFA)
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 300-800 μmol/l (40-150 mg/l).
Valori crescute: vasculite, infarct miocardic acut, infarct pulmonar acut, pancreatită acută, pneumonii, colangite, colecistită, peritonită.
Valori scăzute: stări carenţiale.

8. α_1 lipoproteinele (LP cu densitate mare, HDL)
Metodă: procentaj relativ din lipidogramă în gel de agaroză.
Valori normale: bărbaţi: 25%
femei: 30%.

9. Pre-ß-lipoproteinele (cu densitate foarte mică. VLDL, chilomicroni endogeni)
Metodă: procentaj relativ din lipidogramă.
Valori normale: 2-5%.

10. ß-lipoproteinele (cu densitate mică, LDL)
Valori normale: bărbaţi: 75%.
femei: 70%.

11. Chilomicroni exogeni (CME)
Grăsimi neutre reabsorbite, emulsionate în plasmă.
Metodă: nefelometrică sau fotometrică.
Valori normale: în condiţii obişnuite CME apar numai postprandial în ser, persistă, însă, în condiţii patologice.

12. Lipoproteina X (LP-X)
Lipoproteină patologică, conţinând lipide biliare şi apoproteine diferite. Este prezentă exclusiv în serul bolnavilor cu colestază.
Metodă: electroforetică (în gel de agaroză, migrează catodic).

OLIGOELEMENTE

1. Cuprul (Cu)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 15-24 μmol/l (650-1 650 μg/l) sub formă legată de ceruloplasmina în plasmă.

Valori crescute: reacţie de fază acută (infarct miocardic, glomerulonefrită, hemocromatoză, leucemii, boala Hodgkin, hipertireoză, neoplazii, boli autoimune.

Valori scăzute: boala Wilson, kwashiorkor, sindrom nefrotic, hipocupremie idiopatică.

2. Fierul (Fe)

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 15-25 μmol/l (800-1450 μg/l), sub formă legată de transferină.

Valori crescute: anemii hemolitice, hepatită epidemică acută (sub formă de feritină), glomerulonefrită acută, aplazie medulară, tratament excesiv feripriv, contraceptiv, hemocromatoză.

Valori scăzute: stări postagresionale, anemii feriprive, infarct miocardic, sindrom nefrotic, neoplazii, kwashiorkor, tratament corticosteroidic.

3. Raportul fier/cupru (Fe/Cu)

Valori normale: 0,8-1,11.

MARKERI TUMORALI

Gluco-, lipo-proteine specifice produse de tumori sau asociate tumorilor. Prezenţa lor nu confirmă, absenţa lor nu infirmă cancerul. Nu sunt potrivite nici pentru analize de triaj. Valoarea lor diagnostică creşte prin explorarea simultană şi ţintită a mai multor markeri de origine variată.

1. α_1-Fetoproteina (AFP)

Antigen glicoproteinic *asociat cancerului* hepatocelular primitiv.

Valori normale: < 10 ng/ml (< 7 U/ml).

Valori crescute: carcinom hepatic primitiv, ciroză hepatică biliară.

2. Antigenul Carcinoembrionar (CEA)

Antigen glicoproteinic asociat cancerului gastrointestinal.

Valori normale: < 3,0 ng/ml (< 23 U/ml).

Valori crescute: carcinom colorectal, pancreatic, gastric, pulmonar, mamar, cervical, ovarian (în ordinea descrescândă a frecvenţei).

3. Antigenul glucidic CA 15-3
Antigen tumoral.
Valori normale: < 24 U/ml.
Valori crescute: carcinom mamar, ovarian.

4. Antigenul glucidic CA 19-9 (antigen canceros gastrointestinal, GICA)
Antigen tumoral.
Valori normale: < 37 U/ml.
Valori crescute: carcinom pancreatic, colorectal, biliar.

5. Antigenul glucidic CA 50
Antigen tumoral.
Valori normale: < 23 U/ml.
Valori crescute: carcinom colorectal, pancreatic, mamar.

6. Antigenul glucidic CA 125
Antigen tumoral.
Valori normale: < 35 U/ml
Valori crescute: carcinom ovarian, pancreatic, gastrointestinal

7. Antigenul specific prostatic (PSA)
Marker tumoral.
Valori normale: < 5 ng/ml.
Valori crescute: carcinom prostatic metastazant.
Valori scăzute: stări postagresionale, hepatită vasculobiliară, ciroză biliară, tumori maligne (cu excepţia carcinomului hepatic).

8. Antigenul polipeptidic tisular (TPA)
Marker tumoral.
Valori normale: < 95 U/l.
Valori crescute: carcinom hepatic primitiv, carcinom bronşic, pancreatic, prostatic, vezical, ovarian, uterin, colorectal, nazofaringian.

9. Coriongonadotropina umană (hCG)
Marker tumoral.
Produsă de placentă.
Valori normale: la bărbaţi şi la femei < 5 U/l.
la femei în menopauză < 10 U/l.
Valori crescute: tumorile maligne ale celulelor germinative, seminoame, choriocarcinom, rareori în adenocarcinomul gastric şi pancreatic.

10. Enolaza neuron-specifică (NSE)
Marker tumoral.
Valori normale: < 12,5 μg/ml.
Valori crescute: neurinom, carcinom bronşic microcelular.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. Feritina

Proteina intracelulară fixatoare de fier. Marker tumoral.

Valori normale: bărbaţi< 319 μg/l.
femei< 180 μg/l.
nou-născut < 600 μg/l.

Valori crescute: inflamaţii, tumori, talasemie, anemii sideroblastice, hemocromatoză, hepatopatii.

Valori scăzute: sideropenie, sindrom nefrotic, sindrom malabsorbtiv, graviditate.

12. Fosfataza acidă

Marker tumoral, amestecul a 5 izoenzime (plachetară, eritrocitară, osoasă, macrofag-monocitară şi *prostatică*).

Valori normale: bărbaţi< 4,7 U/l.
femei< 3,7 U/l.
copii< 20 U/l.

Valori crescute: carcinom prostatic, prostatită, metastaze osoase, osteosarcom, mielom, boala Paget, boala Gaucher.

PROTEINE PLASMATICE

Albumine

Metodă: procentaj relativ din proteinogramă sau cantitate absolută calculată din valoarea proteinemiei.

Valori normale: 60-65% din totalul proteinelor plasmatice, 0,46-0,81 mmol/l, 32-56 g/l.

Valori scăzute: insuficienţă hepatică, sindrom nefrotic, arsuri, inflamaţii acute şi cronice, enteropatii, tumori maligne.

Globuline

Reprezintă 35-50% din proteinemia totală. Se compun din circa 60 de fracţiuni individuale.

Metode: procentaj relativ din proteinogramă sau cantitate absolută calculată din valoarea proteinemiei, respectiv dozarea fracţiunilor individuale (imunodifuzie radială, RIA, ELISA).

1. α_1 Antitripsina (AAT)

Glicoproteină relativ micromoleculară, difuzabilă, de origine hepatocelulară. Inhibitorul serinproteazelor.

Valori normale: 37-67 μmol/l (2-4 g/l).

Valori crescute: inflamaţii (microvasculite), tumori maligne, pielonefrită acută, partea terminală a graviditătii .

Valori scăzute: lipsa ereditară a AAT (emfizemul idiopatic al copilului), sindrom nefrotic, insuficienţă hepatică gravă, pneumopatii cronice.

2. *Glicoproteina α_1-acidă (seromucoidul, orosomucoidul)*

Reactant de fază acută.

Valori normale: 12-35 μmol/l (0,5-1,4 g/l).

Valori crescute: inflamaţii, tumori maligne.

Valori scăzute: hepatite acute, insuficienţă hepatică.

3. *α_2-Macroglobulina (AMG)*

Glicoproteină macromoleculară, de origine hepatocelulară şi granulocitară, inhibitorul serinproteazelor, nu este reactant de fază acută.

Valori normale: 2,4-4,5 μmol/l (1,8-3,2 g/l).

Valori crescute: sindrom nefrotic, tumori maligne, diabet zaharat, tratament excesiv estrogenic.

Valori scăzute: insuficienţă hepatică, septicemii, sprue.

4. *β_1-C globulina (factor de complement C3)*

Valori normale: 2,5-7,5 μmol/l (0,5-1,5 g/l).

Valori crescute: în urma vindecării inflamaţiilor (scăderea consumului).

Valori scăzute: din cauza consumului sporit în inflamaţii acute şi cronice active, din cauza sintezei scăzute în hepatopatii cronice (ciroză hepatică) sau pierderilor renale (sindrom nefrotic).

5. *β_2-Microglobulina*

Lanţul peptidic uşor al antigenelor de histocompatibilitate de clasa I (HLA-A, B, C).

Valori normale: 7-18 μmol/l (0,8-2,4 mg/l).

Valori crescute: anurie (uremii), respingerea grefelor renale, tumori maligne, microvasculite, boli autoimune.

6. *Ceruloplasmina*

α_2-Glicoproteină transportoare de cupru (conţinând 0,32% Cu; 6 Cu/mol), reactant de fază acută cu proprietăţi de oxidază.

Valori normale: 1,9-3,4 μmol/l (0,25-0,45 g/l).

Valori crescute: graviditate, inflamaţii acute şi cronice, infarct miocardic, anemii feriprive, boala Hodgkin, leuconevraxită, tumori maligne, unele psihoze endogene.

Valori scăzute: boala Wilson, sindrom nefrotic, kwashiorkor, sprue.

7. *Haptoglobina (HP)*

α_2-glicoproteină de origine hepatocelulară, reactant de fază acută, fixatoare de hemoglobină liberă, având mai multe alotipuri: HP1-1, HP1-2 şi HP2-2.

Valori normale: 15,5-31,0 μmol/l (1-2 g/l).

Valori crescute: inflamaţii acute şi cronice, tumori maligne, metastaze, necroze, icter mecanic.

Valori scăzute: ahaptoglobinemie ereditară, anemii hemolitice acute şi cronice, anemii biermeriene, leziuni hepatice acute şi cronice, mononucleoză infecţioasă.

8. Transferina (siderofilina)

ß-Glicoproteină fixatoare de fier (2Fe pe moleculă).

Valori normale: 50-70 μmol/l (3-4 g/l).

Valori crescute: carenţă de fier, graviditate, contraceptive, anemii posthemoragice, hemosideroza pulmonară ereditară.

Valori scăzute: atransferinemia congenitală, infecţii, inflamaţii acute şi cronice, anemii hemolitice, sindrom nefrotic, tumori maligne, insuficienţă hepatică acută şi cronică.

9. Imunoglobulinele

În cursul fracţionării electroforetice a proteinelor plasmatice în mediu gelificat, imunoglobulinele migrează cu α_2, ß şi în special cu γ-globuline, în funcţie de masa lor moleculară: IgM (cu 2 alotipuri: IgM_1 şi IgM_2) în γ_1, IgA (cu 2 alotipuri: IgA_1 şi IgA_2) în γ_2 şi IgG (cu 4 alotipuri: $IgG_{1,2,3 \text{ şi } 4}$) în γ_3. Din cauza concentraţiilor mici, IgD şi IgE nu pot fi identificate direct în proteinogramă, apar numai în condiţii patologice (limfoame maligne), sub forma *gradienţilor monoclonali (M).*

Valori normale: IgG = 0,04-0,10 mmol/l (10-15 g/l).

Valori crescute: hepatită cronică activă, PCE, glomerulonefrită acută, mielom IgG, endocardită bacteriană subacută.

Valori scăzute: agamaglobulinemie, lipsa selectivă a IgG.

Valori normale: IgA = 0,017-0,020 mmol/l (2,5-3,5 g/l).

Valori crescute: reacţii imune gastrointestinale, respiratorii, hepatite vasculobiliare, herpes simplex, dermatită herpetiformă Dühring, mielom IgA.

Valori scăzute: agamaglobulinemie, lipsa selectivă a IgA.

Valori normale: IgM = 0,06-0,15 μmol/l (0,5-1,5 g/l).

Valori crescute: macroglobulinemia Waldenström, viroze, ciroza biliară, anemii hemolitice, LED, PCE, limfosarcom.

Valori scăzute: agamaglobulinemie, lipsa selectivă a IgM, sindromul Wiscott-Aldrich.

Valori crescute policlonale (IgG + IgA+ IgM): ciroză biliară primitivă, hepatită cronică activă, pielonefrită cronică, poliartrită cronică streptococică.

Valori scăzute policlonale (IgG + IgA + IgM): lipsa congenitală de anticorpi (agamaglobulinemia de tip Bruton), hipoplazie sau aplazie timică, imunosupresiune (imunoparalizie) postvaccinică sau medicamentoasă temporară.

Valori normale: IgD = 0,22-0,25 μmol/l (0,3-0,4 mg/l).

Valori crescute: vasculite, microvasculite hipersenzitive, infecţii cronice, mielom IgD.

Valori normale: IgE = < 5 pmol/l (< 10μg/l, 10 ng/ml).

Valori crescute: stări alergice, şoc anafilactic, boli parazitare, mielom IgE.

10. Lanţuri uşoare izolate (IgU)

Proteinele Bence-Jones, de tip k sau λ, prezente sub formă de *gradient M* în serul şi în urina bolnavilor cu mielom multiplu excretor (boala Kahler, boala lanţurilor uşoare).

11. Lanţuri grele izolate

Din clasele γ, α, μ, δ sau ε, prezente în plasmă dar şi în urina bolnavilor cu boala Franklin, sub forma unui *gradient monoclonal*.

12. Peptidul C

Produsul echimolecular de scindare a proinsulinei în insulină şi peptid C (masa moleculară: 3025 d). Reflectă cantitatea de insulină secretată.

Valori normale: 1,1-3,6 μg/l (ng/ml).

Valori crescute: insulinom.

13. Proteina C-reactivă (PCR)

Reactant neglicoproteinic de fază acută, se formează în elementele mobile şi fixe ale SMM. În cursul electroforezei migrează cu γ-globulinele. Inhibă manifestarea excesivă a mecanismelor de apărare.

Valori normale: < 8 mg/l.

Valori crescute: inflamaţii acute şi cronice, tumori maligne.

14. Crioglobuline

Complexe imune circulante (formate din antigene şi anticorpi) cu solubilitate redusă la rece.

Metodă calitativă: crioprecipitare, fracţionare electroforetică în gel, identificarea antigenelor şi anticorpilor prin imunoprecipitare, stabilind formele *monoclonale* (cu o singură clasă Ig), *biclonale* (cu două clase Ig) şi *policlonale* (cu mai multe clase Ig), conţinând uneori şi alte proteine (factori de complement, fibrinogen, fibronectina etc.).

Metodă cantitativă: precipitare cu polietilenglicol, având masa moleculară de 6000 daltoni (PEG-6000).

Prezenţă în ser: sindrom Raymaud, reticuloze maligne, artrita reumatoidă, leucemia limfoidă cronică, ciroza hepatică, LED, PCE, nefroscleroză, endocardită bacteriană subacută, crioglobulinemia idiopatică.

IV. Explorarea de laborator a urinei

A. Examenul fizic şi chimic calitativ al urinei

a) La *inspecţia* urinei într-un recipient transparent şi curat, se apreciază: *Culoarea*: de la incolor prin galben-pai până la brun închis. În caz de

hemoglobinurie urina apare ca zeama de carne, în caz de *hematurie masivă* este sanguinolentă, în caz de *bilirubinurie* are culoarea brună ca berea, în caz de *melanurie* şi *alcaptonurie* devine neagră în cursul depozitării. Unele *medicamente* excretate în urină modifică culoarea urinei în mod caracteristic: *albastru de metilen* în verde-albastru, *amidazofen* şi alte antialgice, antipiretice, în portocaliu-roşu.

Transparenţa: urina normală este clară şi transparentă. În cursul depozitării se pot sedimenta elemente celulare (*nubeculă*). Din urina acidă şi concentrată se pot sedimenta precipitate roşii (uraţi amorfi de Na şi K), sub formă de *sediment lateriţiu*, ceea ce se dizolvă la cald. Din urina alcalină se precipită uraţii de amoniu, fosfaţii terţiari de calciu.

Miros: urina normală proaspătă are un miros caracteristic aromatic, produs de prezenţa unor acizi organici volatili. În cursul depozitării, ureea se descompune enzimatic, degajând *amoniac*. În cetoacidoză, urina are miros de *acetonă*. În unele infecţii microbiene urina poate conţine şi *hidrogen sulfurat*.

b) Examenul fizic al urinei

Reacţia: – *aciditatea actuală* (valoarea actuală a pH) variază între pH = 4,8-7,8, în funcţie de alimentaţie şi de starea echilibrului acido-bazic.

– *aciditatea titrabilă* a urinei reprezintă acea cantitate de bază (NaOH 0,1 n) sau de acid (HCl 0,1 n) care, adăugată la un volum dat (10 ml) de urină încălzită la temperatura corpului (38° C), aduce aciditatea actuală la valoarea de pH = 7,4.

Valori normale: 50 mmol/l 24 de ore de acizi titrabili.

Valori crescute: acidoze metabolice (numai în cazul unei funcţii renale normale!).

Densitatea: se măsoară direct cu urodensitometrul.

Valori normale: 1024-1040 (normostenurie).

Valori scăzute: 1012-1024 (hipostenurie).

~1010 (izostenurie, d = plasma deproteinizată).

< 1010 (subizostenurie, insuficienţa concentrării urinei).

Notă: substanţele cu molecularitate redusă (glucoză) şi în cantităţi mici, cele cu masa moleculară mare (proteine) în cantităţi însemnate cresc densitatea urinei. Pentru a aprecia valoarea reală a densităţii urinare se deproteinizează urina prin fierbere şi filtrare, respectiv se scade din valoarea citită câte o diviziune după fiecare 2 g de glucoză eliminată pe 24 de ore.

Sedimentul urinar: urina proaspătă se centrifughează, timp de 5-10 minute la 3000 t/min, se pune pe o lamă o picătură din sedimentul de pe fundul eprubetei de centrifugare şi se acoperă cu o lamelă. Se citeşte la microscop cu obiectivul mic. Se apreciază elementele *cristaline*, elementele *celulare*, *cilindrii* hialini, granuloşi şi celulari.

c) Examenul chimic calitativ al urinei

Proteinuria: urina normală conţine urme de proteine, nedecelabile prin precipitare. Proteinuriile pot fi *prerenale* (din cauza unei hiperproteinemii ~ 100 g/l), *renale* (glomerulare) şi *postrenale* (din căile urinare). În funcţie de gravitate, pot fi *selective* (prezenţa exclusivă a albuminelor serice),

semiselective (prezenţa albuminelor şi a unor globuline cu molecularitate mai redusă) şi *neselective* (prezenţa fracţiunilor proteinice din plasmă).

Proteina Bence-Jones este formată din lanţurile uşoare (de tip k sau λ) ale imunoglobulinelor. Se precipită la încălzirea urinei la 70° C şi se redizolvă la 100° C. Apare în forma excretorie nefrotoxică a mielomului multiplu (boala *Kahler*, boala lanţurilor uşoare).

Piuria: se pune în evidenţă prin gelificarea puroiului din urină în mediu puternic alcalin (KOH 20 %). Pozitivitate empirică de o cruce a reacţiei corespunde la circa 7 leucocite din câmpul vizual al sedimentului urinar.

Melituriile: eliminarea patologică a glucozei (glucozuria) şi a altor glucide (fructozurie, manozurie, galactozurie, pentozurie) se pun în evidenţă cu ajutorul testelor specifice corespunzătoare.

Bilirubinuria: se elimină numai bilirubina directă, împreună cu acizii biliari, care duce la scăderea tensiunii superficiale din urină (proba *Hay*, cu sulf precipitat).

Cetonuria: corpi cetonici se elimină în cetoacidoză diabetică, tulburări hidrominerale şi stări carenţiale. Se pun în evidenţă cu proba de nitroprusiat de sodiu, respectiv cu soluţia *Lugol* (acetonă).

Hemoglobinuria: apare în urma unor hemolize de origine ereditară, imună sau toxică, în care hemoglobinemia depăşeşte limita superioară de 12 mmol/l (1 g/l). Hemina din urină se pune în evidenţă prin acţiunea sa peroxidazică: oxigenul eliberat din peroxidul de hidrogen transformă prin oxidare un cromogen incolor (benzidină, guajacol) într-un derivat colorat.

Melanuria: melanogenul incolor format în *melanoamele maligne* se transformă prin oxidare (cu clorura ferică sau nitroprusiat de Na) în melanină de culoare neagră.

Porfirinuria: izomerii I şi III ai uro- şi coproporfirinei se elimină în urină în diferitele forme ale porfiriilor înnăscute eritropoietice şi hepatice, respectiv toxice, dobândite. Porfirinele se pun în evidenţă pe baza fluorescenţei roşii în UV.

Porfobilinogenuria: produs intermediar al biosintezei heminei, se elimină în tulburările secundare ale metabolismului porfirinic. Se pune în evidenţă cu ajutorul reacţiei de culoare roşie dată cu p-dimetilamino-benzaldehidă (reactivul *Ehrlich*), care spre deosebire de ubg, nu este solubil în cloroform.

Urobilinogenuria: creşte în bolile hepatocelulare, lipseşte cu desăvârşire în caz de obstrucţie biliară totală.

B. Examinări chimice cantitative din urina de 24 de ore

1. Acidul 5-hidroxi-indolacetic (HIAA)

Metabolitul serotoninei.

Metodă: fotometrică.

Valori normale: < 47 μmol/zi (9 mg/zi).

Valori crescute: APUD-om, carcinoid intestinal.

2. Acidul uric
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 1,4-4,4 mmol/zi (0,25-0,75 g/zi).
Valori crescute: gută, nefrolitiază, distrugeri celulare masive.
Valori scăzute: insuficienţă renală acută sau cronică.

3. Aldosteron
Metodă: RIA, ELISA.
Valori normale: 6-72 nmol/zi (2-26 μg/zi).
Valori crescute: hiperaldosteronism secundar şi primar (sindromul Conn), sindromul Barner, adenom hipofizar.
Valori scăzute: boală Addison, sindrom adrenogenital.

4. α-Amilaza
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 3-30 μkat/l (130-2000 U/l).
Valori crescute: pancreatita acută, parotidită epidemică, salpingită.
Valori scăzute: insuficienţă renală, hepato- şi/sau splenomegalie.

5. Catecolaminele (acidul vanil-mandelic, homovanilinic)
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 3-34 μmol/zi (0,1-6,8 mg/zi).
Valori crescute: feocromocitom.

6. 17-cetosteroizi
Metodă: fotometrică.
Valori normale: femei = 7-49 μmol/zi (5-12 mg/zi).
bărbaţi = 24-69 μmol/zi (7-17 mg/zi).
Valori crescute: boală şi sindrom Cushing, adenom corticosuprarenal, pubertate precoce, tumoră interstiţială testiculară, ovariană, sindrom adrenogenital.
Valori scăzute: hipofuncţie hipofizară, boala Addison, hipogonadism, hipotireoză, mixedem, stări carenţiale, hipoplazia lipidică a corticosuprarenalelor.

7. Creatina
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 0,08-1,45 mmol/zi (0,01-0,19 g/zi).
Valori crescute: miopatii primare şi secundare, hipertireoză, leucemii acute, metastaze hepatice, acromegalie, arsuri, sindrom Cushing, tratament corticosteroidic.

8. Creatinina
Metodă: fotometrică.
Valori normale: 0,08-0,22 mmol/kg corp/zi (8,8-17,7 mmol/zi, 1-2 mg/zi).
Valori crescute: acromegalie, gigantism, diabet zaharat, infecţii,

hipotireoză, hipogonadism.

Valori scăzute: atrofii musculare, hipertireoză, anemii.

9. 17-hidroxisteroizi

Metodă: fotometrică.

Valori normale: femei: 14-35 μmol/zi (5-12 mg/zi).

bărbaţi: 19-41 μmol/zi (7-15 mg/zi).

Valori crescute: hiperplazie corticosuprarenală, arhenoblastom, adenom sau carcinom corticosuprarenal, tumoră luteală, tumora celulelor Leydig, acromegalie, stări postagresionale.

Valori scăzute: boala Addison, boala Simmonds, mixedem, sindrom nefrotic, tireotoxicoză, diabet zaharat, gută.

10. Estrogeni

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 50-150 nmol/zi (15-45 mg/zi) în ziua a 21-a a ciclului menstrual.

Valori crescute: faza secretorie a ciclului, graviditate.

Valori scăzute: menopauză, amenoree.

11. Pregnandiol

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 0,3-14,2 μmol/zi (0,1-4,5 mg/zi) în ziua a 21-a a ciclului.

Valori crescute: corioepiteliom, sindrom Stein-Levental, hipergonadism corticosuprarenal.

Valori scăzute: disgravidii, făt mort, eclampsie.

12. Uropepsinogen

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 1-10 μkat/zi (30 650 U/zi).

Valori crescute: ulcer duodenal, tratament corticosteroidic (sau cu ACTH), stări postagresionale.

Valori scăzute: anemii biermeriene şi feriprive cu aclorhidrie, gastrite atrofice, stări după gastrectomie totală.

C. Ionograma urinară

1. Calciu

Metodă: fotometrie de emisie.

Valori normale: 2,5-6,25 mmol/zi (0,1-0,25 g/zi).

Valori crescute: hiperparatiroidism, osteoliză, metastaze osoase, mielom multiplu, osteoporoză (sindrom Cushing, acromegalie, hipervitaminoză D, tireotoxicoză, boală Paget, sindrom Fanconi, degenerescenţă hepatolenticulară, hipercalciurie idiopatică.

Valori scăzute: sindrom nefrotic, hipocalcemii, alcaloză.

2. Cloruri

Metodă: electrometrică.

Valori normale: 32-48 mmol/zi (4,2-8,5 g/zi).

Valori crescute: insuficienţă corticosuprarenală, carenţă de potasiu, nefrită cu pierdere de sare, tratament diuretic.

Valori scăzute: stări carenţiale, pierderi gastrointestinale, transpiraţie excesivă, sindrom Cushing, nefroscleroză, diabet insipid.

3. Fosfaţi

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 32-48 mmol/zi (1,0-1,5 g/zi).

Valori crescute: hiperparatireoză, avitaminoză D, sindrom Fanconi-Abderhalden, metastaze osoase, tireotoxicoză, alcaloză.

Valori scăzute: hipoparatireoză, paratireoidectomie, atrofie hepatică, hiperpirexie.

4. Magneziu

Metodă: fotometrică de emisie sau simplă.

Valori normale: 3-5 mmol/zi (0,073-0,122 g/l).

Valori crescute: tratament diuretic excesiv, medicamente nefrotoxice (Cis-Platin, aminoglucozide, amfotericina-B, metotrexat, ciclosporină), boli hemolitice, boala Addison, hipotireoză, hiperaldosteronism.

Valori scăzute: sindrom nefrotic, hipomagneziemie, insuficienţă renală acută şi cronică, pierderi intestinale.

5. Potasiu

Metodă: fotometrică de emisie.

Valori normale: 35-120 mmol/zi (2,7-5,1 g/zi).

Valori crescute: sindrom Cushing, hiperaldosteronism primar, sindrom Fanconi, acidoză metabolică (diabetică), tratament diuretic şi/sau corticosteroidic excesiv.

Valori scăzute: glomerulonefrită acută, nefroscleroză, pielonefrită, azotemie extrarenală cu oligurie, boala Addison, pierderi intestinale.

6. Sodiu

Metodă: fotometrică de emisie.

Valori normale: 120-220 mmol/zi (2,7-5,1 g/zi).

Valori crescute: hipervolemii, sindrom de pierdere renală de sare, hiperaldosteronism, insuficienţă corticosuprarenală, alcaloză metabolică, leziuni hipotalamice.

Valori scăzute: stări postagresionale, carenţă de sare, pierderi intestinale, insuficienţă renală acută sau cronică, sindrom Cushing, tratament corticosteroidic de durată.

V. Explorarea de laborator a tubului digestiv

1. Sucul gastric

Recoltarea sucului gastric se face prin tubaj, cu ajutorul unei sonde de cauciuc de tip Einhorn sterilizată sau al unui tub flexibil din polietilen sterilizat, având la capăt o olivă metalică multiperforată. După Lambling, se aspiră *secreţia bazală*, apoi *debitul orar de bază* şi *debitul orar posthistaminic*, în care se determină aciditatea liberă şi totală, se pun în evidenţă diferiţi componenţi celulari şi chimici (mucină, bilă, acid lactic, microbi, paraziţi, sânge).

Valorile normale:
Secreţia bazală:
volum: 60-80 ml
cantitate totală de HCl: 20-30 mmol/l
Secreţia orară spontană:
volum: 30-40 ml
debitul orar de bază (DOB) al HCl: 1,5-2,5 mmol/l
Secreţia orară posthistaminică (0,5 mg s.c.):
volum: 130-150 ml
cantitate totală de HCl: 40-60 mmol/l
debitul orar posthistaminic (DOH) al HCl: 6-18 mmol/l
Valoarea raportului DOB/DOH = 0,1-0,2

În vederea determinării *masei secretante* a stomacului, în ziua următoare se repetă proba cu o doză maximă (1,5 mg) de histamină, care stimulează circa 80% din celulele parietale gastrice:
Secreţia orară posthistaminică maximă: 180-200 ml
Debitul orar posthistaminic maxim (DOHM) al HCl: 10-20 mmol/l

→ Testul cu insulină (Hollander)

Hipoglicemia moderată (în jurul 3 mml/l = 0,5 g/l) manifestată în urma administrării de 0,2 U/kg corp insulină la unele persoane sensibile provoacă o vagotonie trecătoare, cu creşterea consecutivă a secreţiei gastrice. Pozitivitatea probei indică efectuarea tratamentului chirurgical al bolii ulceroase prin vagotonie.

Aciditatea sucului gastric *creşte* în gastrite acute, boala ulceroasă, tumora Zollinger-Ellison; *scade* până la *anaciditate* şi *achilie gastrică* în gastrite cronice, tumori maligne gastrice, anemie biermeriană.

→ Acidul lactic

Apare în caz de anaciditate, din cauza prezenţei lactobacililor în stomac.

Metodă: calitativă (reacţie de culoare galbenă, dată cu reactivul ferifenolic *Uffelman*).

2. Examenul sucului duodenal (tubajul duodenal, Meltzer-Lyon)

Se efectuează în vederea explorării secreţiei biliare, atât din punct de vedere celular şi parazitologic, cât şi biochimic. Obţinerea bilei prin sonda Einhorn introdusă în duoden se face în 3 timpi, separându-se *bila A* (duodenală), *bila B* (vezicală) şi *bila C* (hepatică). Golirea vezicii (obţinerea bilei B) se provoacă cu ajutorul introducerii intraduodenale a unei soluţii de sulfat de magneziu 25 g % sau de ulei de măsline.

Examenul microscopic se efectuează din sedimentul obţinut în urma centrifugării imediate a bilei recoltate. În condiţii normale apar 1-2 leucocite mono- sau polimorfonucleare. Prezenţa abundentă a acestora, mai ales în bila B, pledează pentru un proces inflamator (colecistită, colangită, colangiolită). În sedimentul bilei proaspete se pot identifica *lamblii*.

Examenul microbiologic se efectuează din bila recoltată steril, în eprubetă sterilă.

Examenul biochimic se rezumă la analiza chimică a concreţiunilor sau microcalculilor biliari, eliminaţi prin bilă, precum şi la studiul activităţii *enzimelor digestive* (amilaza, lipaza, proteazele; cea din urmă, deşi poate fi determinată în sucul duodenal totuşi nu se practică, din cauza surselor mari de eroare în urma gradului nedeterminabil de diluare).

3. Materiile fecale

Recoltarea: într-un recipient curat şi uscat, pentru coprocultură într-un vas steril.

Examenul macroscopic: se controlează *aspectul, culoarea* (acholie), *consistenţa* şi *mirosul* (de fermentaţie, de putrefacţie), prezenţa *sângelui* proaspăt sau coagulat.

Examenul microscopic: se efectuează în urma administrării unui *prânz de probă* după Gaultier sau a unui *regim* de 3 zile după Schmidt şi Strassburger. Examenul se referă la cele 3 elemente alimentare principale: proteine, glucide şi grăsimi. Se urmăreşte prezenţa *fibrelor musculare* nedigerate (semn de lipsă de proteoliză), a granulelor de *amidon* (semn de lipsă de activitate amilazică), precum şi a grăsimilor neutre (semn de lipsă de activitate lipazică).

Examenul parazitologic: se efectuează din supernatantul obţinut prin flotaţie (centrifugare într-un mediu cu densitate mai mare, decât cea a particulelor), dintr-un triturat de materii fecale în mediu hiperosmotic (soluţie salină concentrată). Prin examen microscopic se identifică ouăle de paraziţi, paraziţii întregi sau proglotele lor (tenii).

Examenul microbiologic: din materiile fecale recoltate în recipienţi sterili se fac inoculări pe medii de cultură specifice.

Examenul chimic al materiilor fecale

a) Explorarea hemoragiei oculte (testul Gregersen)

Principiu: pe baza proprietăţii peroxidazice, hemoglobina (şi derivaţii săi) pune în libertate din peroxidul de hidrogen, oxigen nativ, care prin oxidare transformă unii cromogeni incolori (benzidina, guaiacolul, fenolftaleina) în derivaţi coloraţi.

b) Explorarea conţinutului proteic al materiilor fecale

În mod normal, materiile fecale nu conţin proteine. În cazuri de malabsorbţie, diateze exudative, enterocolite etc., materiile fecale pot conţine cantităţi variabile de proteine de origine sanguină (*diaree proteinică*).

Principiu: o porţiune de materii fecale se omogenizează cu un volum egal de ser fiziologic. După centrifugare, din supernatant se efectuează examenul calitativ sau cantitativ al proteinelor, inclusiv fracţionarea lor electroforetică.

VI. Examinarea de laborator a lichidului cefalorahidian (LCR)

Recoltarea LCR se execută pe nemâncate, prin puncţie sterilă lombară sau suboccipitală. Se extrag 10-20 ml lichid, se apreciază tensiunea şi se trece la examinări macroscopice, microscopice, biochimice şi microbiologice.

1. Examenul fizic al LCR

Tensiune: 12-15 mm apă (manometrul *Claude*).

Valori crescute: hipertensiune intracraniană.

Culoare: incolor, transparent, limpede.

Patologic: tulbure, colorat în galben, verzui (bilirubina), în roşu (sânge), purulent.

Densitate: 1002-1008.

Valori crescute: meningite, encefalite.

Aciditate actuală (pH) = 7,25-7,45.

Examenul microscopic al LCR

2. Examenul citologic

Se efectuează prin numărătoarea elementelor celulare pe camerele Fuchs-Rosenthal, Bürker-Türck, Nageotte, din lichid proaspăt, necentrifugat.

Valori normale: 2-3 leucocite/μl.

Valori crescute: meningite.

3. Examenul morfologic

Se efectuează pe sedimentul LCR, centrifugat şi decantat. O picătură de sediment se aplică şi se întinde pe o lamă, se usucă, se fixează cu alcool: eter (1:1) şi se colorează cu soluţie de albastru de metil sau Giemsa. În sediment se pot găsi: granulocite neutrofile, limfocite, monocite, plasmocite, respectiv celule endoteliale normale sau alterate. În inflamaţii microbiene predomină granulocitele, în cele virotice, limfocitele.

4. Examenul microbiologic şi virusologic, respectiv serologic

Se efectuează din LCR recoltat într-un recipient steril.

5. Examenul biochimic al LCR

– Glicorahia

Metodă: fotometrică enzimatică

Valori normale: 3,0-4,5 mmol/l (0,55-0,70 g/l).

Valori crescute: tumori cerebrale, encefalite, diabet zaharat, oligofrenie.

Valori scăzute: meningite acute (Neisseria, Tbc).

– Ionograma LCR

Calciu: 1,38-1,50 mmol/l (55-60 mg/l).

Valori crescute: paralel cu creşterea proteinorahiei.

Cloruri: 120-130 mmol/l (4,2-4,6 g/l).

Valori crescute: deshidratări, acidoză hipercloremică, leziuni hipotalamice, alcaloză respiratorie, hiperparatiroidism primar, nefrite, abcese şi tumori cerebrale.

Valori scăzute: stări hipocloremice, meningite acute netuberculoase (meningococice).

Magneziu: 0,5-0,7 mmol/l (12-18 mg/l).

Fără semnificaţie patologică.

Potasiu: 2,3-3,8 mmol/l (90-140 mg/l).

Fără semnificaţie patologică.

Sodiu: 133-147 mmol/l (3,1-3,4 g/l).

Fără semnificaţie patologică.

– Proteinorahia

Metode calitative:

Reacţia Pandy

Principiu: soluţia saturată de fenol precipită proteinele din LCR. Proba se evaluează de la negativ (LCR clar) prin una (opalescentă), două (tulburare) şi trei cruci (tulburare lăptoasă).

Valori pozitive: meningite, leuconevraxită, tumori medulare, pneumonii grave, tifos exantematic.

Metoda Nonne-Appelt

Principiu: precipitarea globulinelor cu o soluţie de sulfat de amoniu la semisaturaţie.

Evaluare: apariţia unui inel de precipitare la nivelul de separare a LCR şi a reactivului care se notează cu una, două sau trei cruci.

Valori pozitive: meningite (luetice).

Metode cantitative:

Dozarea fotometrică a proteinorahiei:

Valori normale:

LCR ventricular:1,0-1,5 g/l

LCR cisternal:2,0-2,9 g/l

LCR lombar:3,0-4,0 g/l

Valori crescute: meningite acute (microbiene, virotice, fungice), infecţii cronice (Tbc, leuconevraxite, paralizie progresivă), hemoragii subarahnoidiene, neoplazii cerebrale, absces cerebral, polinevrite acute, mieloză funiculară (anemia biermeriană), mixedem, intoxicaţie cu plumb, sindrom Guillain-Barré.

– Proteinograma LCR

Se efectuează în mediu gelificat sau pe folie de acetat de celuloză, din LCR concentrat de 10-50 de ori prin ultrafiltrare sau în direct, prin electrofocusare. Se remarcă apariţia prealbuminelor, în rest, aspectul proteinogramei este similar celei din ser. Din cauza concentraţiilor lor reduse, pentru dozarea cantitativă a imunoglobulinelor din LCR se folosesc metode suficient de sensibile, ca RIA, ELISA.

VII. Explorarea de laborator a transsudatelor şi exsudatelor

Lichidele acumulate în cavităţi fiziologice (cavitatea pleurală, abdominală, articulară) din motive mecanice (stază) sunt de obicei clare, transparente, cu o densitate redusă (d = 1 006-1 016) şi cu un conţinut protidic sub 40 g/l. Diferenţierea orientativă a transsudatelor şi a exsudatelor inflamatoare se face pe baza aprecierii aproximative a conţinutului lor proteinic.

1. Reacţia Rivalta

Principiu: proteinele în concentraţie de peste 30-40 g/l se precipită cu acid acetic diluat. Lichidul de cercetat se picură într-un cilindru conţinând 100-200 ml de acid acetic 0,5‰. În cazul apariţiei unei opalescenţe ca un fum de ţigară, lichidul se consideră exsudat. În caz negativ, el este transsudat.

2. Examinările citologice, bacteriologice şi serologice

Se efectuează în mod analog cu cele prezentate în cazul LCR.

3. Dozarea proteinelor

Metodă: fotometrică.

Valori: < 30-40 g/l = transsudate.

> 30-40 g/l = exsudate.

4. Proteinograma

Se efectuează prin aplicarea directă (fără concentrare) a lichidului pe mediul gelificat sau folia de acetat de celuloză. În proteinogramele transsudatelor, predomină albuminele şi globulinele cu masa moleculară mai mică, proteinogramele obţinute din exsudate se aseamănă cu cele serice, cu predominanţa reactanţilor de fază acută.

5. Enzimograma

În transsudate activitatea enzimelor de origine plasmatică este condiţionată de masa lor moleculară, precum şi de perioada lor de înjumătăţire. Ca urmare, activitatea enzimelor prezente în transsudate este totdeauna inferioară celei serice. În schimb, în cazul unor enzime de origine tumorală, ca aldolaza, lactat-dehidrogenaza, unele glucozil-transferaze etc., secretate direct în cavităţi (pleurale, peritoneale, articulare), activitatea acestora este semnificativ mai mare decât în plasmă.

VIII. Examinarea de laborator a sudoarei

Sudoarea se obţine sub acţiunea locală a pilocarpinei, aplicând o compresă izolatoare dintr-o folie de polietilen. Se determină cantitatea sodiului şi a clorurilor, cantitatea potasiului fiind superioară potasemiei circa de 2,2 ori.

1. Cantitatea sodiului în sudoare

Metodă: fotometrică de emisie.

Valori normale: 15-23 mmol/l (0,245-0,530 g/l).

Valori crescute: > 50 mmol/l (până la 120 mmol/l), în fibroza cistică a pancreasului.

2. Cantitatea clorurilor în sudoare

Metodă: fotometrică.

Valori normale: 10-24 mmol/l (0,355-0,852 g/l).

Valori crescute: > 5 mmol/l (până la 120 mmol/l), în fibroza cistică a pancreasului.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

EDITURILE ALL

ALL ♦ ALL BECK ♦ ALLFA
ALL EDUCATIONAL

NU SE TIMBREAZĂ
CORESPONDENȚĂ RĂSPUNS
C.R.
SE TAXEAZĂ LA DESTINAȚIE

Bd. Timişoara nr. 58, sector 6, 76548 - Bucureşti sau C.P. 12-107
Tel. : (01) - 402 26 00; (01) - 402 26 20 ; (01) - 402 26 11
Fax: (01) - 402 26 10 - Fax Distribuţie: (01) - 402 26 30

TALON DE COMANDĂ

Trimiteți talonul de comandă, completat conform dorinței dumneavoastră, pe adresa Editurilor ALL:
Bucureşti, O.P. 12, C.P. 107,
beneficiind de o reducere de preț de **10%**

EXPEDITOR (VĂ RUGĂM SĂ COMPLETAȚI CÂT MAI CITEȚ POSIBIL)

Nume şi adresă (persoană fizică): _____

_____ Telefon: _____

Nume şi adresă (instituție, firmă, şcoală): _____

_____ Telefon: _____

Cod client: _____ **Profesie:** _____

Plata va fi efectuată de: ☐ (persoană fizică) ☐ (instituție, firmă, şcoală)

DESTINATAR

EDITURILE ALL

Bucureşti, O.P. 12, C.P. 107

Menţionaţi domeniile pentru care doriţi să primiţi, GRATUIT, buletinul informativ semestrial:

- ☐ DREPT / ECONOMIE
- ☐ ŞTIINŢE EXACTE / INFORMATICĂ
- ☐ BULETIN INFORMATIV GENERAL (preţuri)
- ☐ MEDICINĂ
- ☐ ŞTIINŢE UMANISTE
- ☐ BELETRISTICĂ

PLATA SE VA FACE RAMBURS (LA PRIMIREA COLETULUI POŞTAL). TAXELE POŞTALE DE EXPEDIȚIE FIIND SUPORTATE DE EDITURĂ.

PENTRU COMENZI MAI MARI DE 10 EXEMPLARE, CUMULAT, BENEFICIAȚI DE O REDUCERE DE PREȚ DE 20%

Cod	Titlu / Autor	Preţ	Nr. ex. comandate
	MEDICINĂ UMANĂ		
961	ANATOMIA OMULUI - vol. I - Victor Papilian	149000 lei	
962	ANATOMIA OMULUI - vol. II - Victor Papilian	199000 lei	
1555	ANATOMIE TOPOGRAFICĂ - Ion Albu, Radu Georgia	69000 lei	
1556	ATLAS DE ANATOMIE LA PATUL BOLNAVULUI Nicolae M. Constantinescu	29000 lei	
1557	ATLAS DE ANATOMIE WINTERTHUR Karl-Josef Moll, Michaela Moll	119000 lei	
1558	FUNDAMENTELE BIOFIZICII MEDICALE - vol. I Aurel I. Popescu	29000 lei	
1559	ÎNDREPTAR PENTRU PRESCRIEREA MEDICAMENTELOR Valentin Stroescu, Iosefina Corciovei-Constantinescu, Ion Fulga, Oana Andreia Coman	49000 lei	
906	ALERGOLOGIE. FIZIOPATOLOGIE, DIAGNOSTIC, TRATAMENT Colectiv de autori, coordonat de Ion Gr. Popescu	139000 lei	
917	ICD-10 CLASIFICAREA TULBURĂRILOR MENTALE ŞI COMPORTAMENTALE - Norman Sartorius	74900 lei	
1560	DIAREI ACUTE INFECŢIOASE - Ileana Rebedea, Irina Rebedea	29000 lei	
1125	PARTICULARITĂŢI TERAPEUTICE ÎN GERIATRIE Colectiv de autori OMS	29900 lei	
1561	RITMURI CARDIACE PRIN MECANISM RECIPROC Alexandru Drafta	10000 lei	
019	ANESTEZIA SUBARAHNOIDIANĂ ŞI PERIDURALĂ - Ion Cristea	17900 lei	
1562	GINECOLOGIE - Petrache Vârtej	99000 lei	
1563	OBSTETRICĂ FIZIOLOGICĂ ŞI PATOLOGICĂ Colectiv de autori, coordonat de Petrache Vârtej	119000 lei	
1564	OTORINOLARINGOLOGIE PEDIATRICĂ Mihai Buruiană, Maria Ivanovici, Nicolae Mustăţea	119000 lei	
1565	PATOLOGIE RINOSINUZALĂ LA COPIL - Mihai Buruiană, Nicolae Mustăţea, Andrei Buruiană, Dragoş Mustăţea	29900 lei	
1566	DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN HEMOSTAZĂ Florica Enache, Maria Stuparu	59000 lei	
1567	EXPLORAREA ULTRASONICĂ A SISTEMULUI VASCULAR CERVICO-CEREBRAL - Andrei Nistorescu	49000 lei	
1117	TRATAMENTUL TUBERCULOZEI. DIRECTIVELE OMS PENTRU PROGRAMELE NAŢIONALE - Colectiv de autori OMS	29900 lei	
1568	INVESTIGAŢII FUNCŢIONALE ÎN PRACTICA MEDICINEI DE FAMILIE Marinela Olăroiu, Alexandru Gheorghiu	59000 lei	
1569	AFECŢIUNILE BUCO-DENTARE ŞI SARCINA Henriette Panaite, Petrache Vârtej, Memet Gafar	29900 lei	
1057	INTRODUCERE ÎN MEDICINA LEGALĂ ANTROPOLOGICĂ. CAUZALITATE ŞI RESPONSABILITATE - Virgil-Tiberiu Dragomirescu	79900 lei	
1570	MEDICAMENTE MODERNE DE SINTEZĂ - Gheorghe Dănilă	39000 lei	
1571	SĂNĂTATE PUBLICĂ ŞI MANAGEMENT SANITAR Dan Enăchescu, Mihai Gr. Marcu	29000 lei	
1572	TRATAT DE MEDICINĂ LEGALĂ ODONTO-STOMATOLOGICĂ (ediţie broşată) Virgil-Tiberiu Dragomirescu	39000 lei	

Editurile ALL îşi rezervă dreptul de a face modificări asupra preţurilor menţionate!

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

179000

Medicina modernă se bazează din ce în ce mai mult pe datele exacte ale ramurilor ştiinţelor naturale limitrofe, începând cu biochimia. Ca urmare, fenomenele normale şi patologice ale vieţii pot fi identificate şi interpretate exclusiv la nivelele moleculare ale structurilor funcţiilor vitale. Cuceririle biochimiei moderne sunt indispensabile şi pentru medicina practică. Însuşirea acestor cunoştinţe de către medicii practicieni este însă îngreunată de faptul că manualele de "biochimie medicală" prezintă conţinutul lor valoros în forma deosebită a ramurii ştiinţifice şi în limbajul profesional al specialiştilor. Apare deci necesitatea stringentă a unei surse de documentare biochimice, sub forma unei "biochimii pentru medici", care să prezinte materialul esenţial al biochimiei moderne la un nivel ştiinţific înalt, dar într-un limbaj accesibil nespecialiştilor. Prezentul tratat de "Biochimie clinică - Patochimie" are tocmai menirea să fie o primă încercare în realizarea acestui deziderat, adresându-se nu numai medicilor practicieni şi studenţilor în medicină, dar şi acelora care doresc să cunoască tainele funcţionării propriului organism.

Prof. Dr. Ioan Matei

ISBN 973-684-021-2

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERS

11436/00